

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE ÈS SCIENCES BIOPHYSIQUES

PAR

Mohammed EL KINDI

INCORPORATION D'AMPHIPHILES À UNE SEULE CHAÎNE CARBONÉE DANS LES VÉSICULES
LIPIDIQUES UNILAMELLAIRES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE

AOÛT 1985

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À mes parents,
à mes frères et soeurs,
à Carmen et Camille,
à tous mes amis,

en témoignage d'affection et de reconnaissance.

À ceux et celles qui
œuvrent pour le progrès
de la Science.

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué sous la direction de Monsieur le professeur Mario Fragata. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour la confiance qu'il m'a témoignée, les conseils et l'appui qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail. Monsieur Fragata n'a jamais ménagé ses efforts pour me permettre de mener à bien cette recherche.

Je tiens à exprimer tout mon respect à Monsieur François Bellemare pour l'aide considérable qu'il n'a pas hésité à m'apporter chaque fois que j'en ai eu besoin.

Enfin, mes remerciements vont également à tous mes amis, qui n'ont pas cessé de m'encourager, et aussi à tous mes ennemis, dont les critiques ont été des plus stimulantes.

TABLE DES MATIÈRES

<u>Remerciements</u>	iii
<u>Table des matières</u>	iv
<u>Liste des tableaux</u>	viii
<u>Liste des schémas</u>	viii
<u>Liste des figures</u>	ix
<u>Liste des abréviations</u>	xiii

I : INTRODUCTION GÉNÉRALE

<u>I.1. Etat de la question</u>	2
I.1.1. Structure moléculaire des amphiphiles	2
I.1.2. Mécanismes d'auto-association	6
I.1.3. Formation de micelles et de vésicules en milieu aqueux	9
<u>I.2. Définition des objectifs</u>	14

II : INCORPORATION DE LA CHLOROPHYLLE a DANS LES **VÉSICULES UNILAMELLAIRES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE**

II.1. <u>Introduction</u>	20
II.2. <u>Procédures expérimentales</u>	26
II.2.1. Matériel ~	26
II.2.2. Préparation des vésicules mixtes PC/Chla	27
II.2.3. Détermination de la concentration de la PC	29
II.2.4. Détermination de la concentration de la Chla	30
II.3. <u>Résultats</u>	31
II.3.1. Caractéristiques des vésicules mixtes de PC/Chla ...	31
II.3.2. Mode d'incorporation de la Chla	40
II.4. <u>Discussion</u>	46

III : INCORPORATION DE LA STÉARYLAMINE DANS LES **VÉSICULES UNILAMELLAIRES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE**

III.1. <u>Introduction</u>	49
---	----

III.2. <u>Procédures expérimentales</u>	52
III.2.1. Préparation des vésicules mixtes PC/SAM	52
III.2.2. Détermination de la concentration de la PC	52
III.2.3. Détermination de la concentration de la SAM	52
III.2.3.1. Réaction du TNBS avec les α -amines	52
III.2.3.2. Dosage de la SAM par le TNBS	55
III.3. <u>Résultats</u>	57
III.3.1. Caractéristiques des vésicules mixtes de PC/SAM ...	57
III.3.2. Mode d'inclusion de la SAM	65
III.4. <u>Discussion</u>	68
IV : <u>DISCUSSION GÉNÉRALE</u>	
IV.1. <u>Mélanges Chlorophylle a - Phosphatidylcholine</u>	72
IV.2. <u>Mélanges Stéarylamine - Phosphatidylcholine</u>	74
IV.3. <u>Quelques conclusions concernant le mode</u> <u>d'incorporation des amphiphiles à une seule</u> <u>chaîne carbonée</u>	76
<u>RÉFÉRENCES</u>	83

Liste des tableaux

I: Composition relative des lipides à chaîne isoprène dans la membrane des thylacoïdes extraite des chloroplastes d'épinard	21
II: Composition molaire d'amphiphiles à chaîne isoprène dans la bicouche d'une petite vésicule lipidique unilamellaire	38

Liste des schémas

1: Étapes de préparation des petites vésicules unilamellaires	28
2: Réaction du TNBS avec les α -amines en solution aqueuse	54

Liste des figures

1: Structure chimique de quelques phospholipides	3
2: Structure chimique de la phosphatidylcholine extraite du jaune d'oeuf	4
3: Structure chimique de quelques lipides à une seule chaîne carbonée	5
4: Illustration schématique d'une micelle et d'une vésicule dans l'eau	12
5: Région de la concentration micellaire critique pour une solution aqueuse du dodécylsulfate de sodium	13
6: Propriétés dynamiques de regroupement de lipides et structures éventuelles que ces derniers sont capables de former	15
7: Structures chimiques de quelques lipides à chaîne isoprène	23
8: Liaison de coordination entre le magnésium central de la chlorophylle et l'oxygène du groupement phosphate de la phosphatidylcholine	25

9: Profil d'élution (colonne de gel de sépharose 4-B) d'une dispersion de vésicules mixtes préparées à partir d'un mélange PC/Chl <u>a</u>	32
10: Profils d'élution (colonne de gel de sépharose 4-B), exprimés en concentrations de P _i et de Chl <u>a</u> , d'une dispersion de vésicules mixtes préparées à partir d'un mélange PC/Chl <u>a</u>	34
11: Turbidité apparente à 300 nm des vésicules lipidiques contenant la Chl <u>a</u> (fraction molaire initiale de 1%) en fonction de la concentration en P _i et en Chl <u>a</u>	35
12: Concentration en Chl <u>a</u> <u>vs</u> concentration en P _i pour les tubes 37 à 42 éluées à partir d'échantillons de vésicules mixtes PC/Chl <u>a</u> préparées aux fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41% de Chl <u>a</u>	37
13: Profils de turbidité spécifique apparente des vésicules mixtes PC/Chl <u>a</u> préparées aux fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41% de Chl <u>a</u>	39
14: Turbidité spécifique apparente des fractions 37 à 42 en fonction de la concentration de P _i pour quelques fractions molaires de Chl <u>a</u>	41

15: Turbidité spécifique apparente ([P _i]) en fonction de la proportion de Chl <u>a</u> incorporée dans les vésicules unilamellaires	42
16: Comportement de l'incorporation de la Chl <u>a</u> dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires en fonction du mélange initial de la PC et de la Chl <u>a</u>	44
17: Rapport final/initial en fonction de la fraction molaire initiale de la Chl <u>a</u> incluse dans des vésicules lipidiques unilamellaires	45
18: Mobilité électrophorétique de vésicules contenant l'acide phosphatidique et la stéarylamine	50
19: Structures chimiques de la SAM, du TNBS et produit de la trinitrophénylation de la SAM	56
20: profil d'élution d'une dispersion de vésicules mixtes préparées à partir de la PC et de la SAM	58
21: Absorbance à 300 nm des vésicules lipidiques contenant la SAM en fonction de la concentration du phosphore inorganique et de la concentration de la SAM	59

22: Concentration de la stéarylamine en fonction de la concentration du phosphore inorganique pour les tubes 31 à 37 pour l'échantillon préparé à la fraction molaire initiale 0,92% de SAM	61
23: Série de profils d'élution de dispersions de vésicules mixtes préparées à partir de différentes fractions molaires initiales de SAM	62
24: Agrandissement de la région délimitée dans la figure 23	64
25: Comportement de l'inclusion de la SAM dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires en fonction du mélange binaire initial de la PC avec la SAM	66
26: Rapport externe/total pour la SAM dans les vésicules lipidiques en fonction du mélange binaire initial de la PC avec la SAM	67
27: Comportement de l'incorporation d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée dans la bicouche lipidique d'une vésicule	77

Liste des abréviationsChl_a : chlorophylle a

| PS : phosphatidysérine

Chol. : cholestérol

| SAM : stéarylamine

Co-Q₁₀ : ubiquinone-10

| SH : thiocholestérol

DPPC : dipalmitoylphosphatidylcholine

| TNBS : trinitrobenzène sulfonate

DSPC : distéaroylphosphatidylcholine

| TNP-SAM : trinitrophényl-SAM

PE : phosphatidyléthanolamine

| α -Toc. : α -tocophérol

PI : phosphatidylinositol

Chapitre I

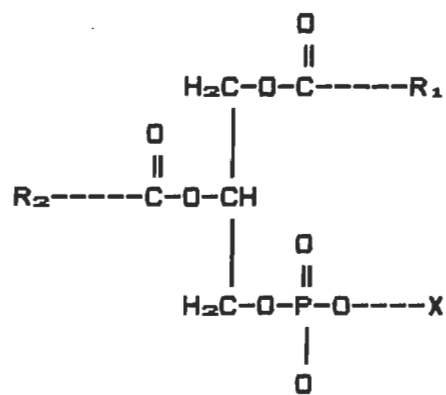
INTRODUCTION GÉNÉRALE

I.1. ÉTAT DE LA QUESTION

I.1.1. Structure moléculaire des amphiphiles

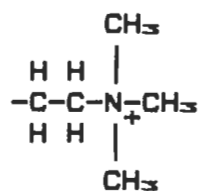
Le caractère amphiphilique désigne la double affinité des molécules à l'égard de l'eau et des hydrocarbures. Ces molécules sont ainsi constituées d'un groupement hydrophile et d'une partie hydrophobe généralement hydrocarbonée (voir fig. 1 - 3). Les lipides, des substances naturelles présentes dans toutes les membranes des cellules vivantes, sont considérés comme étant des amphiphiles typiques. On reconnaît, par exemple, dans la molécule de la phosphatidylcholine (fig. 2), la partie lipophile qui est constituée d'un diglycéride à longues chaînes aliphatiques, et la partie hydrophile amphotère (Zwitterion) qui est formée d'un groupe phosphorylcholine. Nous représentons dans les figures 1 et 3 quelques amphiphiles respectivement à deux chaînes carbonées et à une chaîne carbonée.

Notons que la chaîne hydrocarbonée est responsable de l'affinité vis-à-vis des hydrocarbures et des solvants non polaires; c'est la partie hydrophobe. Elle peut revêtir des structures chimiques très variées et avoir une architecture linéaire ou ramifiée. En outre, elle peut être constituée d'une seule chaîne paraffinique, mais aussi de deux, voire de plusieurs chaînes attachées à un même groupe hydrophile. Enfin, elle peut appartenir à la famille des corps aliphatiques ou posséder des doubles liaisons éthyléniques ou des noyaux aromatiques.

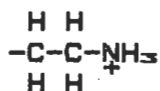


X = -H

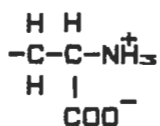
Acide phosphatidique (PA)



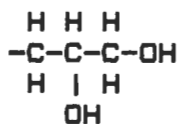
Phosphatidylcholine (PC)



Phosphatidyléthanolamine (PE)

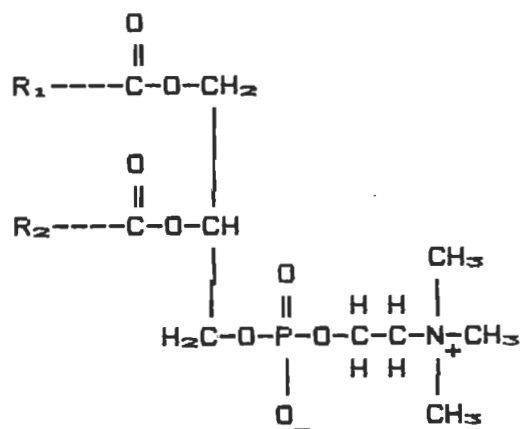


Phosphatidylsérine (PS)



Phosphatidylglycérol (PG)

Figure 1. Structure chimique de quelques phospholipides à deux chaînes carbonées. Les groupes R₁ et R₂ désignent les chaînes hydrocarbonées dont la longueur naturelle varie entre 16 et 22 atomes de carbone.

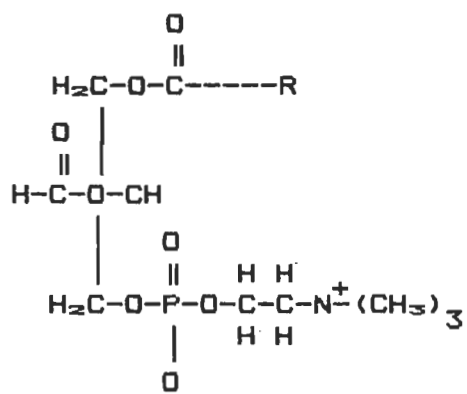


Avec :

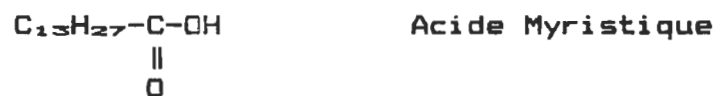
R ₁	R ₂	% (1)
<hr/>		
16:0		37,7
	16:1	3,1
18:0		9,2
	18:1	32,9
	18:2	17,0
<hr/>		

(1) Singleton et al, 1965

Figure 2. Structure chimique de la phosphatidylcholine extraite du jaune d'oeuf et composition des chaînes carbonées R₁ et R₂.



Lysophosphatidylcholine



Acides gras à chaîne carbonée saturée

Figure 3. Structure chimique de quelques lipides à une seule chaîne carbonée.

D'autre part, la tête polaire est responsable de l'affinité envers l'eau et les solvants polaires; c'est la partie hydrophile. Elle aussi peut se présenter sous différentes formes. Elle est ionisable quand elle est formée d'un groupe anionique (ex. une fonction carboxylique), d'un groupe cationique (ex. une fonction ammonium) ou d'un groupe amphotère (ex. une fonction phosphorylcholine). Elle est non ionique quand elle est constituée soit d'une chaîne hydrosoluble étendue (généralement une chaîne polyoxyéthylénique), soit d'un groupe compact (ex. un résidu sorbitol).

I.1.2. Mécanismes d'auto-association

Le caractère amphiphilique a son origine, nous l'avons vu plus haut, dans l'ensemble des interactions qui s'exercent entre telle ou telle partie de l'amphiphile et le milieu dans lequel elles se trouvent. La nature de toutes ces interactions est très variée. Cependant, on peut les grouper, pour besoin de simplification, en :

a - interactions hydrophiles, c'est-à-dire toutes celles qui s'exercent entre les têtes polaires des amphiphiles et l'eau agissant comme solvant, de même que les interactions réciproques entre les têtes polaires elles-mêmes; et

b - les interactions hydrophobes, c'est-à-dire celles qui s'exercent uniquement entre toutes les chaînes dans la région hydrocarbonée.

Il faut remarquer à ce propos que des forces électrostatiques s'exercent entre les ions positifs et négatifs lorsque les parties hydrophiles sont ionisées, et se manifestent également entre les ions et les dipôles présents dans le système. Quant à l'eau, elle joue un rôle important puisqu'elle est loin d'être un milieu inerte et continu. Elle possède d'une part une structure locale prononcée, et constitue d'autre part un milieu solvatant très puissant.

Dans un milieu aqueux, l'association de molécules d'amphiphile (Tanford, 1973, Israëlchvilli et al, 1976 et Nagarajan et al, 1979) en structures bien définies (voir fig. 4 plus loin), telles que micelles (formées à partir d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée) et vésicules (formées à partir d'amphiphiles à deux chaînes carbonées), dérive partiellement de l'interaction hydrophobe entre les chaînes carbonées, qui est alors à l'origine de leur regroupement. Elle dérive aussi de la nature hydrophile des têtes polaires, laquelle impose à ces dernières la nécessité d'être en contact avec l'eau. La reconnaissance de l'interférence de ces deux effets, dans la formation des micelles et des vésicules, a donné lieu au concept des deux "forces opposées" (Tanford, 1973): l'une, attractive, due à l'interaction entre chaînes carbonées tend à diminuer l'aire de la surface de la tête polaire qui est en contact avec l'eau, tandis que l'autre, répulsive, au niveau des têtes polaires, tend à l'augmenter. Ces interactions sont à l'origine de "l'aire optimale" de la surface par tête polaire à laquelle l'énergie libre totale d'interaction par molécule d'amphiphile est minimale.

Des théories thermodynamiques (Tanford, 1973, Israëlachvilli et al, 1976 et Nagarajan et Ruckenstein, 1979), ont été proposées pour expliquer ce phénomène d'assemblage. Dans certains cas, le point de départ consistait en des expressions empiriques qui tenaient compte des variations de l'énergie libre d'interaction entre les molécules d'amphiphiles. La plus représentative de ces démarches a été développée d'abord pour les systèmes micellaires (Tanford, 1973), et s'est étendue ensuite aux vésicules lipidiques (Israëlachvilli et al, 1976 et Nagarajan et Ruckenstein, 1979). Dans le traitement de Tanford, la variation de l'énergie libre totale est décomposée en interactions attractives dues à la nature hydrophobe des chaînes carbonées, et en interactions répulsives dues aux têtes polaires. La composante attractive tend à minimiser le contact entre les chaînes carbonées et l'eau, et est supposée être indépendante de la nature des têtes polaires. Elle a été estimée (Tanford, 1973, pp. 5 - 8) à partir de l'énergie libre résultant du transfert d'une chaîne aliphatique de l'eau vers un hydrocarbure liquide. Il faut remarquer que la variation de l'énergie libre tient compte de la variation de la concentration micellaire critique (CMC) avec l'augmentation de la longueur de la chaîne de l'amphiphile (Tanford, 1974).

Par ailleurs, afin d'expliquer la dimension finie des agrégats, il faut considérer une composante répulsive dans la variation de l'énergie libre totale. Pour les amphiphiles ioniques, une des contributions à cette composante répulsive provient de la répulsion électrostatique entre les

têtes polaires. Certes les autres contributions répulsives n'ont pas encore été identifiées, mais on peut estimer, d'une manière empirique (Tanford, 1974), la partie répulsive, soit à partir des valeurs expérimentales de la concentration micellaire critique (voir fig. 5), soit à partir des données provenant des études en monocouches. On présume que cette composante dépend de la nature des têtes polaires et de la distance les séparant, et qu'elle est indépendante de la longueur de la chaîne carbonée.

I.1.3. Formation de micelles et de vésicules lipidiques en milieu aqueux

Lorsque des molécules d'amphiphile à une seule chaîne sont dispersées dans l'eau, elles peuvent conduire à une ségrégation de leurs parties hydrophobes par auto-association, expulsant de ce fait les molécules d'eau vers l'extérieur. Les produits de cette agrégation sont connus sous le nom de micelles (Tanford, 1973). Ces dernières (fig. 4a) peuvent être perçues comme des particules consistant en un noyau hydrocarboné pseudo-liquide protégé par une enveloppe renfermant les têtes polaires des molécules de l'amphiphile. On parle de noyau pseudo-liquide parce que les chaînes carbonées de l'amphiphile sont généralement dans un état de désordre lorsqu'elles sont aliphatiques. Ceci est vrai quand la température est au delà d'une température critique qui est celle de la transition de phase gel - cristal liquide de l'amphiphile en question. La preuve de la nature pseudo-liquide de l'intérieur de la micelle est fourni par l'habilité de

celle-ci à dissoudre les hydrocarbures et autres substances hydrophobes (voir e.g. Pal et Moulik, 1983). À titre d'exemple, mentionnons qu'un mélange binaire savon/eau est une solution micellaire typique (voir e.g. Mukerjee, 1975). Certes le savon est moléculairement dispersé dans l'eau quand sa concentration est faible, mais ses molécules se regroupent en micelles dès que la concentration est plus grande. Le passage de l'état moléculaire à l'état micellaire s'effectue dans une zone très étroite de concentrations qui porte le nom de concentration micellaire critique (CMC) (fig. 3). Cette dernière est influencée par la nature de l'amphiphile, la température et la force ionique du solvant (Tanford, 1973).

En plus des structures fermées ayant une partie interne non-aqueuse, les micelles, on a observé la formation de structures fermées ayant une partie interne aqueuse lorsque des phospholipides sont dispersés dans l'eau (Bangham et al, 1965). Ces structures (vésicules lipidiques ou liposomes) sont caractérisées par un grand nombre de lamelles concentriques (couches bimoléculaires), lesquelles peuvent être brisées à l'aide de méthodes adéquates (voir chapitre II), afin de donner lieu à des structures constituées d'une seule couche bilipidique (voir fig. 4b). Depuis la découverte de Bangham et al (1965), l'utilisation des vésicules comme modèles membranaires (Sessa et Weissman, 1968) ou comme véhicules de drogues (Grégoriadis, 1976a et 1976b) a connu un développement rapide. Les vésicules lipidiques (fig. 4b) peuvent être préparées à partir d'une grande variété de lipides amphiphiles ou de mélange de lipides. Les phospholipides (fig. 1), composants majeurs des membranes biologiques, sont les plus

utilisés pour la préparation des vésicules. Ils peuvent être obtenus par extraction et purification à partir de sources naturelles (voir e.g. Singleton et al, 1965). En outre, d'autres espèces de phospholipides, avec une composition homogène d'acides gras saturés (e.g, la dimyristoyl-, la dipalmitoyl- et la distéaroyl-phosphatidylcholine) peuvent être préparées synthétiquement.

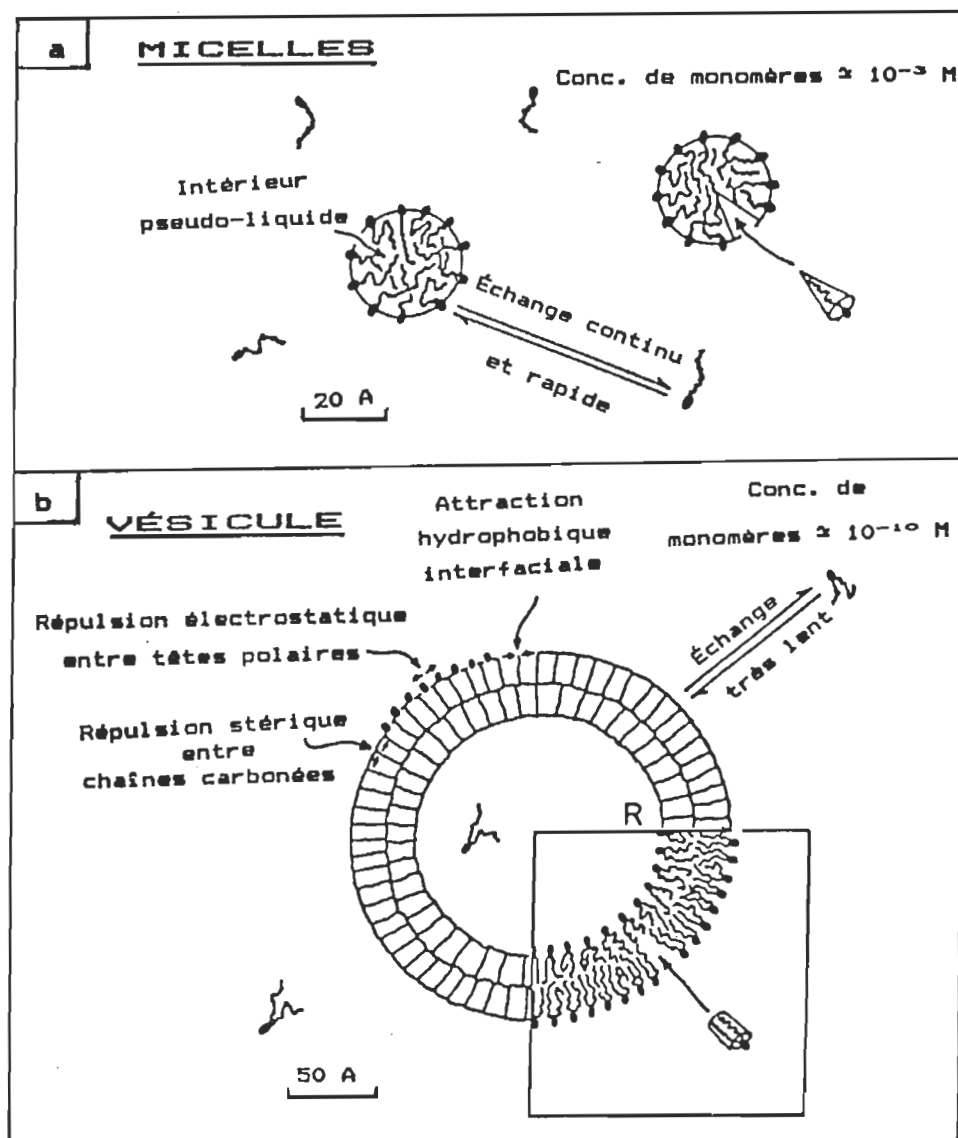


Figure 4. Illustration schématique d'une micelle et d'une vésicule dans l'eau (d'après fig. 4.1 dans Israëlachvilli et al, 1980).

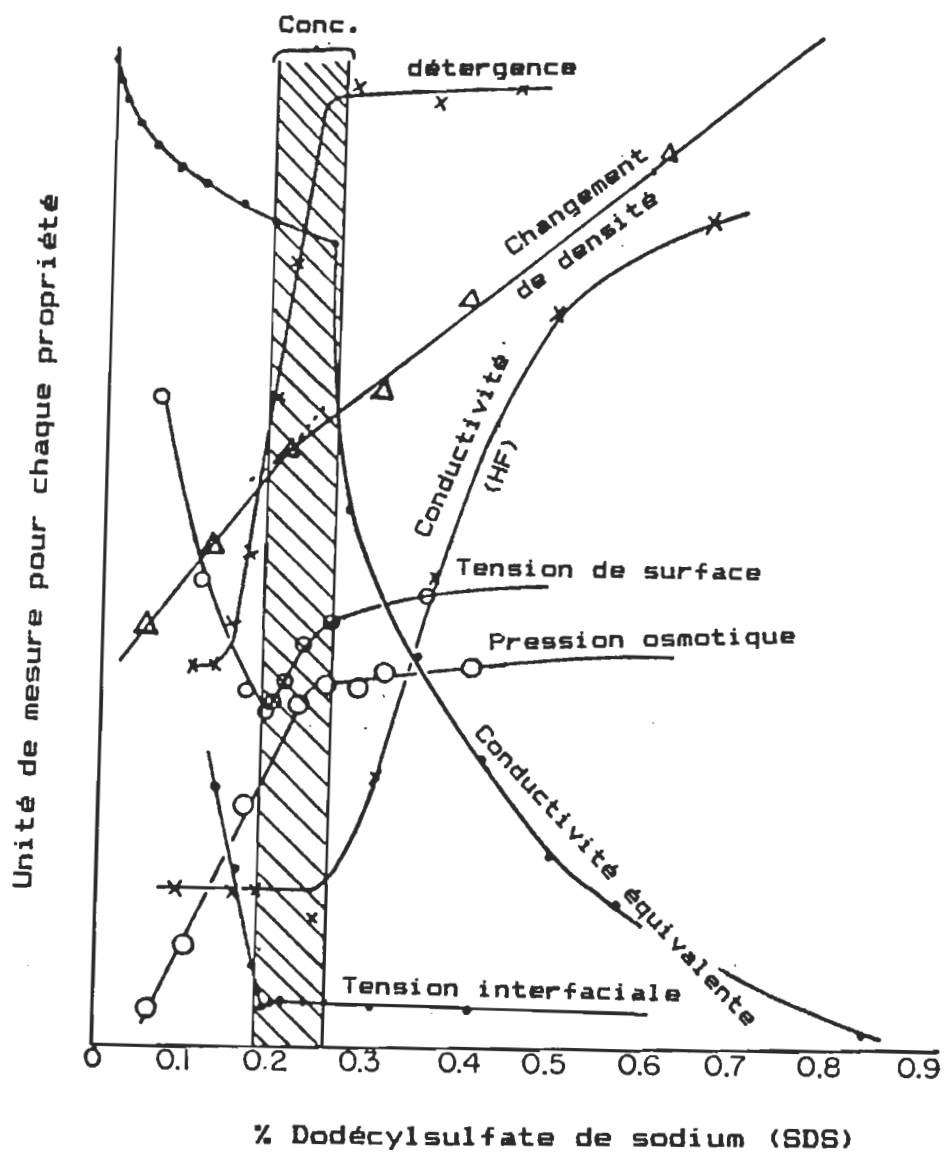


Figure 5. Région de la concentration micellaire critique (CMC) pour une solution aqueuse du dodécylsulfate de sodium (d'après réf. 41 dans Adamson, 1982).

1.2. DÉFINITION DES OBJECTIFS

Étant donné la formation de micelles à partir d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée et de vésicules à partir d'amphiphiles à deux chaînes carbonées (voir section I.1), il a été postulé (Israëlvilli et al, 1980) que la nature de la dispersion des lipides dans l'eau dépend principalement de la forme des molécules (voir fig. 6). Seules les molécules qui préfèrent un arrangement en bicouche, e.g les phospholipides (cf. fig. 6a et b) formeront des vésicules dans un environnement aqueux. Cependant, des amphiphiles autres que les phospholipides peuvent aussi former des vésicules (e.g. Hupfer et Ringsdorf, 1981 et Fendler, 1981) pourvu que leur forme soit proche de celle d'un cylindre. Ceci n'est pas le cas des lipides dont la forme moléculaire est plus proche de celle d'un cône. Ces lipides ont tendance à se regrouper soit en micelles sphériques soit en micelles cylindriques (fig. 6c et d). On voit ainsi que l'habilité à former des vésicules constituées de mélanges de lipides différents (vésicules mixtes) devrait dépendre du mécanisme de formation des agrégats. Dans ce sens, ce qui a été dit sur la formation de structures à partir d'un même type d'amphiphile (voir section I.1.2.), c'est-à-dire l'état pseudo-liquide de l'intérieur de la vésicule et le rôle de l'attraction hydrophobe et la répulsion entre les têtes polaires ("forces opposées"), reste valable dans le cas d'agréats mixtes. Remarquons finalement que la membrane biologique naturelle est le résultat d'un regroupement de divers lipides et protéines qui constitue un cas très complexe.

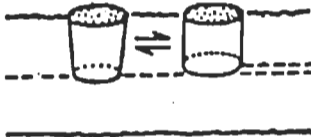
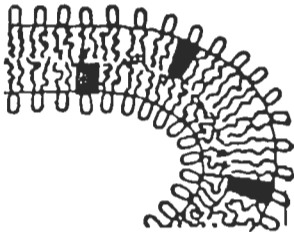
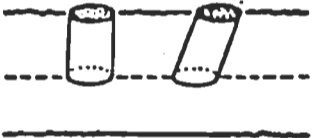
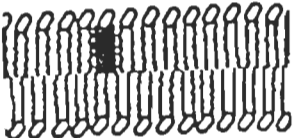
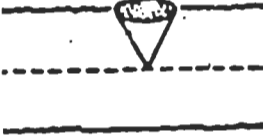

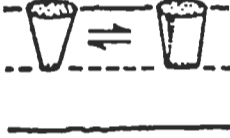

	lipide	forme critique de regroupement	Structure formée
a	Lipides à deux chaînes, avec large tête polaire: lécithine, sphingomyéline. Phosphatidylsérine dans l'eau, phosphatidylglycérol, phosphatidylinositol, acide phosphatidique, certains lipides avec petites têtes polaires non chargées.	Cône tronqué et élargi 	Bicouche flexible ou vésicules 
b	Lipides à deux chaînes avec petites têtes polaires. Lipides anioniques, phosphatidyléthanolamine, phosphatidylsérine + Ca^{2+} .	Cylindre 	Bicouche plane 
c	Lipide à une chaîne, (détergents) avec large tête polaire. Quelques lysophospholipides.	Cône 	Micelle sphérique 
d	Lipide à une chaîne avec petite tête polaire. Lipides non-ioniques et lysolécithines.	Cône tronqué 	Micelle cylindrique ou globulaire 

Figure 6. Propriétés dynamiques de regroupement de lipides et structures éventuelles que ces derniers sont capables de former (d'après fig. 4.2 dans Israëlachvilli et al, 1980).

On voit alors l'avantage d'approcher ces études à l'aide de modèles de vésicules mixtes et nous avons suivi cette voie de recherche dans notre travail.

Parmi les questions fondamentales qui découlent de la formation de vésicules mixtes en milieu aqueux, nous avons étudié:

- la capacité de solubilisation des couches bilipidiques;
- la localisation des espèces solubilisées dans les vésicules; et
- l'effet des espèces solubilisées sur la stabilité et les dimensions des vésicules.

Pour ce faire, nous avons utilisé trois amphiphiles dont deux sont d'origine naturelle, soit la chlorophylle a (Chla) et la phosphatidylcholine (PC), et le troisième est d'origine synthétique, la stéarylamine (SAM). La PC formera l'échafaudage de la vésicule lipidique unilamellaire qui va servir de matrice ("solvant") solubilisante tandis que la Chla et la SAM joueront le rôle d'espèces solubilisées. Il est à noter que la Chla ne forme pas de micelles typiques lorsqu'ajoutée toute seule à l'eau (e.g, Katz, 1979), ce qui n'est pas le cas de la SAM qui se regroupe facilement en micelles au sens propre du terme (Panzner et Jansons, 1979).

Dans ce contexte, nous essaierons d'apporter des réponses à la question suivante: que se passe-t-il lorsque l'on mélange dans l'eau un amphiphile à deux chaînes carbonées, la PC, avec des amphiphiles à une seule chaîne carbonée, la Chla ou la SAM?

Ainsi dans le chapitre II, nous analyserons la question du mélange binaire PC/Chla. La Chla joue un rôle prépondérant dans l'acte photosynthétique puisqu'elle est considérée comme le plus important photorécepteur. Son choix pour ce travail (voir aussi chap. II) est basé sur le fait que cet amphiphile fait partie intégrante du groupe des lipides à chaîne isoprène (les lipides prényls) lesquels sont largement impliqués dans le transfert d'électrons et d'énergie dans les membranes des chloroplastes et dans celles des mitochondries. On cherchera en particulier à discerner la capacité d'une vésicule lipidique unilamellaire à incorporer un amphiphile à chaîne isoprène, la chlorophylle a (voir à ce propos les travaux antérieurs par Dijkmans et al, 1979a et b) et l'effet de celle-ci sur la stabilité de la structure du système lamellaire de la vésicule lipidique.

Par ailleurs, toute molécule hydrophobe ou amphiphile devrait, ordinairement, être capable de pénétrer dans la bicouche lipidique. Si la substance ajoutée est un amphiphile à une seule chaîne aliphatique (ex. les lysophospholipides), le système garderait son caractère de bicouche seulement à faible concentration de l'additif. Une destruction progressive de l'état bicouche et une éventuelle formation de micelles contenant quelques lipides pourraient avoir lieu au fur et à mesure que la proportion de

l'amphiphile à une seule chaîne est augmentée (Tanford, 1980). Nous étudierons cette question à l'aide de l'incorporation de la stéarylamine dans les vésicules constituées de phosphatidylcholine. Ceci fait l'objet du chapitre III.

Finalement, le chapitre IV comporte une étude comparative de l'inclusion de ces deux amphiphiles dans des vésicules lipidiques unilamellaires. En nous basant sur d'autres études concernant l'incorporation de lipides à chaînes isoprènes, de lysophospholipides et d'acides gras, nous chercherons à comprendre s'il y a une relation entre la structure chimique d'un amphiphile et sa quantité solubilisée dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires.

Chapitre II

INCORPORATION DE LA CHLOROPHYLLE a DANS LES VÉSICULES UNILAMELLAIRES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE

II.1. INTRODUCTION

L'acte primaire de la photosynthèse se déroule dans un milieu hautement organisé, la membrane du thylacoïde. Cette organisation résulte d'interactions moléculaires diverses. Ainsi, la compréhension de l'architecture moléculaire de la membrane photosynthétique est une étape essentielle vers l'élucidation détaillée de son fonctionnement. Il a été établi que la majeure partie de la chlorophylle est associée aux protéines intrinsèques ou extrinsèques des thylacoïdes (Andersson et Anderson, 1980). Cependant, une étude récente de Eigenberg et al (1981) a montré que les thylacoïdes des feuilles d'épinard contiennent des molécules de chlorophylle qui sont très probablement liées aux molécules lipidiques des membranes.

La partie lipidique de la membrane des thylacoïdes se compose de 25 à 30% en poids de lipides à chaîne isoprène, de 45 à 60% de glycolipides et de 9 à 12% de phospholipides (Lichtenthaler et Park, 1963). Les lipides à chaîne isoprène (tableau I) sont répartis dans la bicouche lipidique de façon à jouer un rôle prépondérant dans l'acte photosynthétique (Lichtenthaler, 1979). Parmi ceux-là, on retrouve des capteurs d'énergie (chlorophylles, carotènes, xanthophylles) et des transporteurs d'électrons à travers la bicouche de la membrane (quinones). La chlorophylle, considérée comme le plus important photorécepteur dans la photosynthèse, est un amphiphile. Sa tête polaire est constituée d'un grand cycle aromatique avec un système d'électrons π hautement délocalisé, tandis que sa portion

Tableau I : Composition relative des lipides à chaîne isoprène dans la membrane des thylacoides extraite des chloroplastes d'épinard
(Lichtenthaler, 1979).

Chlorophylle <u>a</u>	100
Chlorophylle <u>b</u>	38
β -Carotène	13
Lutéine	14
Violaxanthine	5
Neoxanthine	2
Plastoquinone-9	5
α -Tocophérol (vitamine E)	2,5
α -Tocoquinone	0,4
Phylloquinone (vitamine K ₁)	0,7

hydrophobe est une chaîne phytyle composée de 5 unités isoprènes (fig. 7). Plusieurs études faites à l'aide de membranes artificielles (e.g. Oettmeier et al, 1976 et Fragata, 1977) ont montré que le noyau tétrapyrrolique de la chlorophylle est localisé dans la région des têtes polaires des couches bilipidiques constituées de phosphatidylcholine, tandis que la chaîne phytyle est parallèle aux chaînes hydrocarbonées de la région hydrophobe.

Au niveau moléculaire, deux types d'interactions entre la chlorophylle et les lipides sont à considérer (cf. Katz, 1979):

a) les interactions qui sont mises en jeu entre la chaîne phytyle de la chlorophylle et les longues chaînes aliphatiques des acides gras des lipides. Par encombrement stérique, les groupements méthyles latéraux de la chaîne isoprène peuvent empêcher les mouvements trans-gauche des chaînes saturées (Schmidt et al, 1976) ou les mouvements cis-trans des chaînes insaturées (Diplock et Lucy, 1973). De plus, une chaîne isoprène peut interagir avec plus d'une chaîne lipidique (Maggio et al, 1977), donnant ainsi lieu à un enchevêtrement des chaînes carbonées. Par conséquent, une diminution dans la diffusion latérale des lipides s'ensuivra (Yamauchi et Matsushita, 1979). Ceci, évidemment, engendrerait un état solide plus ordonné dans la bicouche lipidique et favoriserait un processus qui requiert un transfert d'énergie de longue portée entre un donneur et un accepteur (Chan et al, 1979).

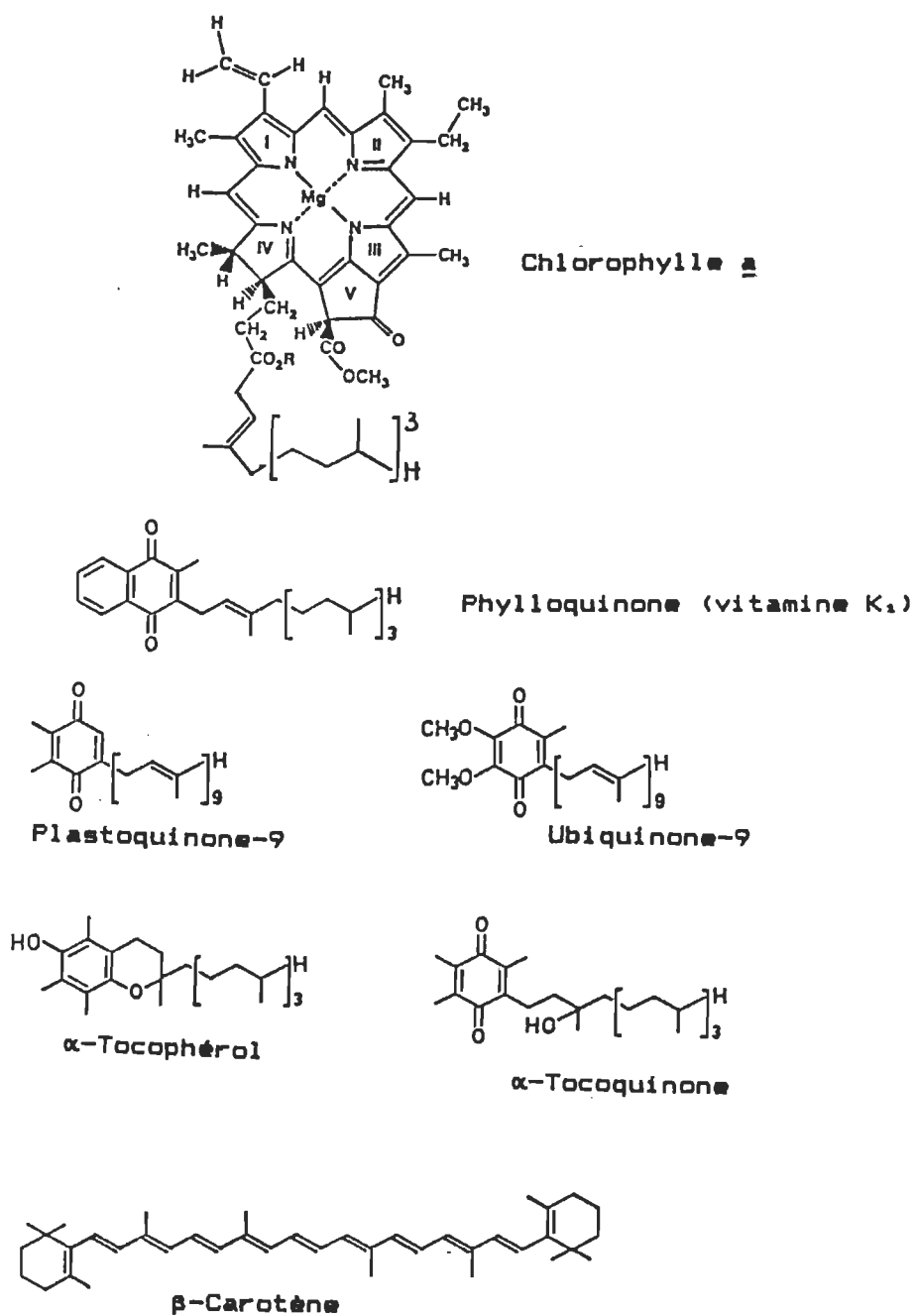


Figure 7. Structure chimique de quelques lipides à chaîne isoprène.

b) les interactions de coordination qui pourraient exister entre l'atome de magnésium central du noyau chlorine et un groupement donneur ou nucléophile du lipide; par exemple, la figure 8 montre une liaison avec l'atome d'oxygène du groupement phosphate du lipide (Chan et al, 1979).

L'étude de ces interactions est importante. En effet, au cours de ce travail, nous avons montré (cf. Résultats) que la variation du rapport molaire Chla/PC des lipides incorporés dans la membrane donne lieu à des non-linéarités des courbes $[\% \text{Chla}]_{\text{finale}} \text{ vs } [\% \text{Chla}]_{\text{initiale}}$ (cf. fig. 16) qui sont vraisemblablement le résultat de changement de l'état d'organisation des couches bilipidiques. Nous pensons en particulier à la formation probable de "micro-domaines" ou des "séparations de phase" dans l'espace de la bicouche lipidique. Cependant, il ne nous a été pas possible au cours de cette étude de procéder à la caractérisation de ces états physiques.

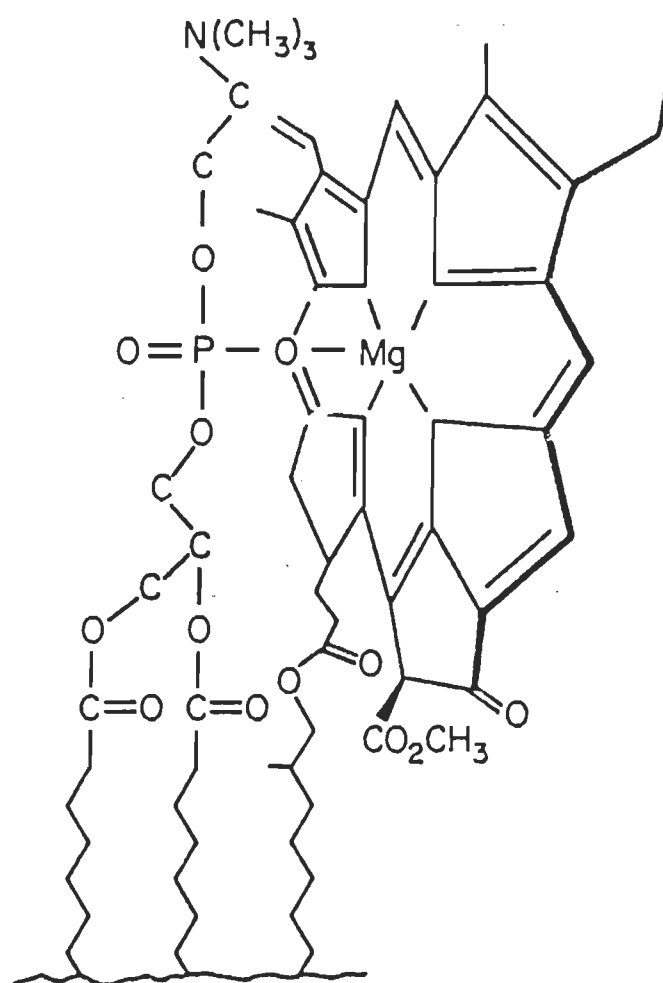


Figure 8. Liaison de coordination entre le magnésium central de la chlorophylle et l'oxygène du groupement phosphate de la phosphatidylcholine (d'après fig. 13 dans Chan et al, 1979).

II.2. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

II.2.1. Matériel

La phosphatidylcholine (PC) est extraite du jaune d'oeuf et purifiée suivant la méthode de Singleton et al (1965). La pureté du produit récupéré a été vérifiée à l'aide de la chromatographie sur couche mince (chloroforme : méthanol : eau = 65 : 25 : 4). Le produit donnait un seul point de couleur orange sur une plaque de gel Silica G (Sigma Chemical Co., lot 93C-1390).

La chlorophylle a (Chla) est extraite des feuilles d'épinards et purifiée suivant la méthode d'Omata et Murata (1980). Ainsi après avoir broyé des feuilles fraîches d'épinard en les trempant dans l'acétone, on récupère tous les pigments par un mélange approprié de dioxane et d'eau. Le complexe pigments-dioxane séché est élué dans une colonne de DEAE sépharose CL-6B pour permettre la séparation des deux chlorophylles a et b du reste des pigments. Le premier solvant utilisé est l'acétone qui élue tous les caroténoïdes et un deuxième solvant (acétone:méthanol = 10:3) aide à récupérer les deux chlorophylles. Ce mélange séché est dissous dans l'hexane:isopropanol (40:1) et passé dans une autre colonne de sépharose CL-6B. En augmentant progressivement la proportion d'isopropanol, on réussit à éluer en premier la Chla et par la suite la Chlb.

II.2.2. Préparation des vésicules mixtes PC/Chla

Les divers mélanges de la PC et de la Chla (fractions molaires bien définies) ont été préparés pour la formation de membranes suivant la procédure de Thompson et al (1974) (voir résumé des étapes au schéma 1). Le poids de la PC, avant mélange, se situait entre 100 et 120 mg, tandis que celui de la Chla variait pour donner les fractions molaires initiales désirées (0 à 6% de Chla, voir e.g fig. 16).

Pour un mélange donné, les deux lipides sont dissous dans du chloroforme qui sera évaporé sous un jet d'azote ou d'argon; ceci évitera l'oxydation des lipides. Puis un volume de 8 - 10 ml d'un tampon Tris-HCl 0,01 M (pH = 8,0), NaCl 0,1 M, est ajouté aux deux lipides secs. La dispersion est faite à l'aide d'un vortex, suivie d'une sonication pendant 15 - 20 min. dans une cellule "sonifier disrupter" (Heat System-Ultrasonics, modèle W-225R). La puissance de sortie du sonicateur est fixée à 20 W. Par la suite la dispersion est centrifugée à 100 000xg durant une heure, afin d'éliminer les lipides non dispersés et les particules de titanium en provenance de la sonde. Le surnageant (environ 9 ml) est prélevé et son volume ramené à 1 ml dans une cellule Amicon (filtre MX 100A).

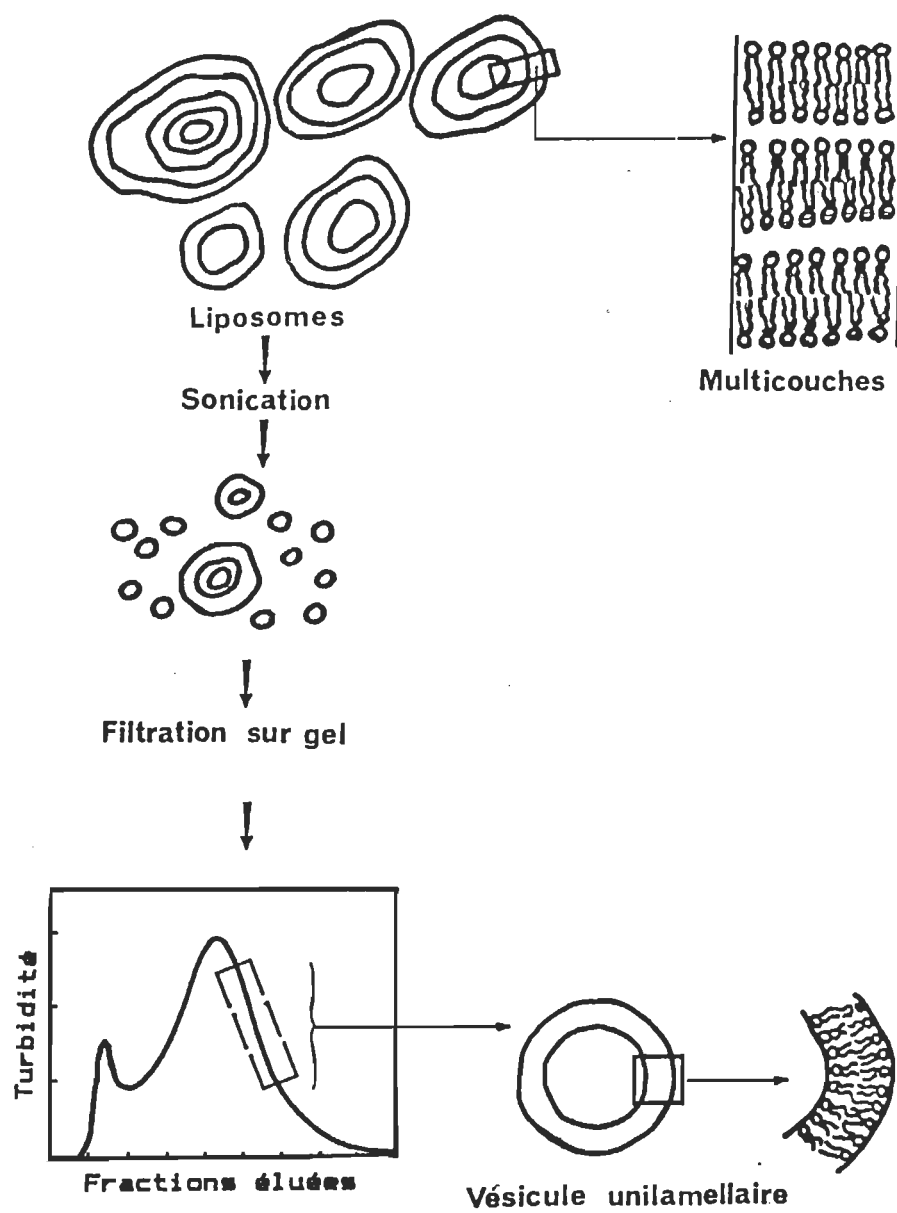


Schéma 1. Étapes de préparation des petites vésicules unilamellaires.

Finalement, ce volume de 1 ml est injecté dans une colonne (2,5 x 60 cm) de gel Sépharose 4-B (Pharmacia Fine Chemicals), et des fractions de 5 à 6 ml sont collectées. Seules celles où la dispersion contient des vésicules homogènes (classe III dans le profil d'élution, fig. 9) sont retenues pour de futurs dosages de la PC et de la Chla (voir détail dans section II.3.1.)

II.2.3. Détermination de la concentration de la PC

Chaque molécule de la phosphatidylcholine contient un seul groupement phosphate (PO_4^{-3}). Par conséquent la concentration de la PC sera évaluée par l'intermédiaire d'une détermination de la concentration des PO_4^{-3} d'après la méthode suivante (Bartlett, 1959):

- 1 ml des fractions éluées est traité par du H_2SO_4 concentré et le tout est chauffé à très haute température, ceci afin de briser tous les liens covalents dans les molécules de lipides.

- après refroidissement des échantillons, deux gouttes de H_2O_2 sont ajoutées et le tout est réchauffé à très haute température. Le H_2O_2 sert à éliminer le matériel carbonisé.

- 4 ml d'eau distillée sont rajoutés à chaque échantillon pour qu'ensuite soit ajouté 1 ml d'une solution de molybdate d'ammonium et 1 ml d'une solution d'Elon (sulfate de p-méthylaminophénol; Eastman Kodak Co.).

Après développement de la couleur bleue, la densité optique est lue à 660 nm, et comparée à une courbe standard d'une solution de KH_2PO_4 dont la pente est égale à 0,625 ml/ μmole . Et c'est ainsi que l'on détermine la teneur en PC des vésicules lipidiques unilamellaires.

II.2.4. Détermination de la concentration de la Chla

La concentration de la Chla, dans les différentes fractions éluées, est déterminée conformément à la procédure de Ritt et Walz (1976).

Pour ce faire, on prend 1 ml de chaque fraction à quoi on ajoute 3 ml de chloroforme saturé d'eau. Après agitation à l'aide du vortex, on centrifuge le tout, pendant 5 min., dans une centrifugeuse de table. Ceci permet une séparation des deux phases (aqueuse et organique). Cette dernière contenant la Chla sera prélevée et sa densité optique est lue à 665 nm (c'est le maximum d'absorbance de la Chla dans le chloroforme). Ainsi, la concentration de la Chla est calculée en utilisant son coefficient d'extinction molaire dans le chloroforme saturé d'eau. Ce coefficient a été évalué à $6,23 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ à partir d'une courbe standard de la Chla.

II.3. RÉSULTATS

II.3.1. Caractéristiques des vésicules mixtes de PC/Chla

La figure 9 montre un profil typique d'élution d'une dispersion contenant des vésicules mixtes (voir définition plus haut, page 14) préparées à partir de la PC et de la Chla. Les résultats de la fig. 9 sont donnés en unités de turbidité apparente $T_a = T_r(PC) + A(Chla)$, où $T_r(PC)$ est la turbidité réelle à 300 nm due aux vésicules lipidiques et $A(Chla)$ est l'absorbance à 300 nm de la Chla. La dispersion, à laquelle se réfère la figure a été obtenue par sonication du mélange binaire PC/Chla (1% de Chla), suivie d'une centrifugation et d'une filtration sur un gel sépharose 4-B. Elle consiste en 3 classes principales:

- la classe I renfermant de larges vésicules multilamellaires;
- la classe III renfermant de petites vésicules unilamellaires d'un diamètre variant de 20 à 25 nm;
- la classe II contenant une population non-homogène constituée partiellement de vésicules de type I et de type III.

Remarquons, à ce propos, que les vésicules nommées ici classe III correspondent aux vésicules homogènes caractérisées par Huang (1969; cf. sa fig. 1).

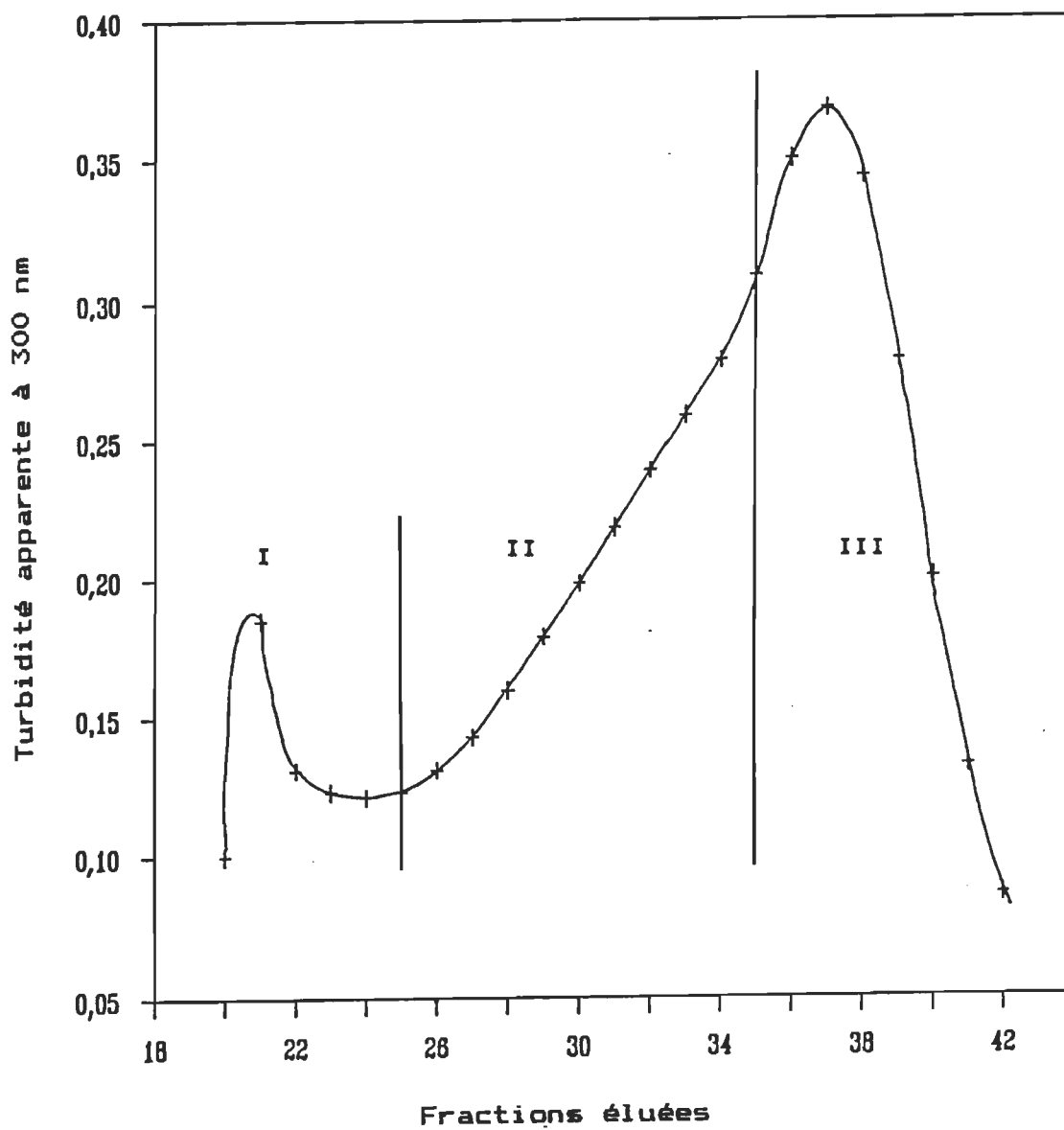


Figure 9. Profil d'élution (colonne de gel sépharose 4-B) d'une dispersion de vésicules mixtes préparées à partir d'un mélange PC/Chl_a dont la fraction molaire initiale est de 1% de Chl_a.

La teneur de ces vésicules en PC (exprimée en concentration de phosphore inorganique P_i) et en $Chla$, dans les diverses fractions éluées à partir de la colonne de sépharose 4-B, est montrée dans la figure 10. On constate aisément que les patrons d'élution des deux lipides sont similaires. Ceci est en relation avec les quantités relatives de PC et de $Chla$ que les vésicules incorporent pour une fraction molaire initiale de $Chla$ donnée.

La variation de T_a en fonction des concentrations de P_i et de $Chla$ est tracée dans la figure 11. Les nombres adjacents aux points expérimentaux correspondent aux numéros des fractions éluées représentées sur la figure 9. Les droites, dans la figure 11, représentent les concentrations de P_i et de $Chla$ dans les fractions 37 à 42, et sont obtenues par la méthode de la régression linéaire. Les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,998 et 1,000. Ainsi, on voit clairement que la turbidité apparente pour les vésicules de type III est proportionnelle aux concentrations de PC et de $Chla$. Ceci est une indication que les fractions, dont le numéro varie de 37 à 42, renferment des vésicules de dimension homogène (voir Mason et Huang, 1978, et Bellemare et Fragata, 1981, pour plus de détails sur les dimensions des vésicules unilamellaires). Par contre, les fractions 25 à 36, représentées dans la fig. 11, contiennent des mélanges hétérogènes de vésicules (type II) et il n'est pas aisé d'établir la proportionnalité entre T_a et la concentration de $Chla$.

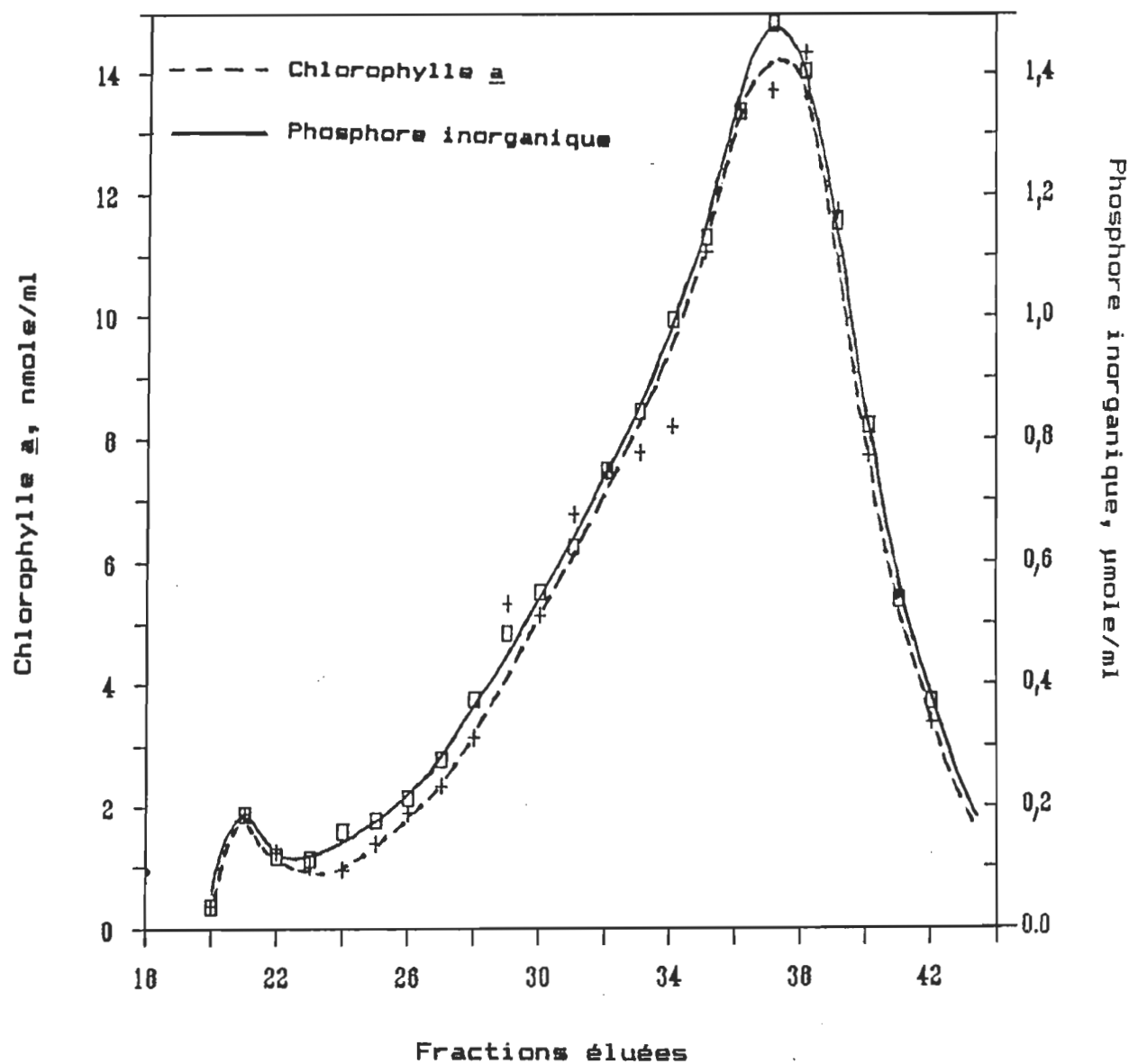


Figure 10. Profils d'élution (colonne de gel sépharose 4-B), exprimés en concentrations de P_i et de $Chla$, d'une dispersion de vésicules mixtes préparée à partir d'un mélange PC/ $Chla$ dont la fraction molaire initiale est de 1% de $Chla$.

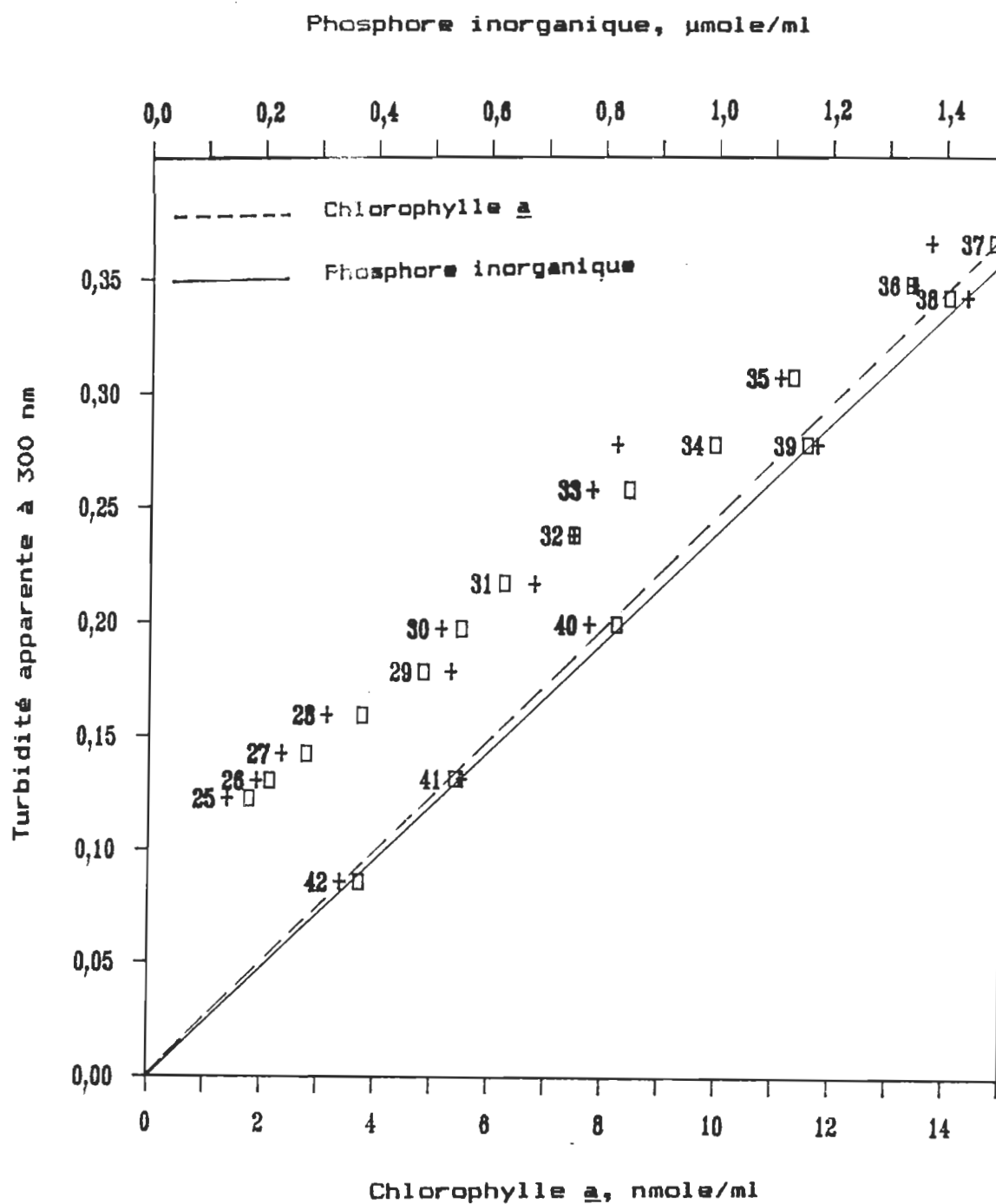


Figure 11. Turbidité apparente à 300 nm des vésicules lipidiques contenant la Chla (fraction molaire initiale de 1%) en fonction de la concentration en P_i et de la concentration en Chla.

Une preuve supplémentaire étayant de l'hypothèse d'homogénéité des vésicules de type III est donnée dans la figure 12. C'est-à-dire que la concentration de Chla est strictement proportionnelle à la concentration de PC. Les droites, obtenues par régression linéaire, passent par l'origine et les coefficients de corrélation sont respectivement de 0,994 , 0,995 et 0,994 pour les fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41% de Chla . Il est intéressant de remarquer, à titre d'exemple, que ces droites permettent de déterminer les fractions molaires finales de Chla incorporées dans les vésicules lipidiques unilamellaires. Dans ce cas particulier on a 0,99 , 3,62 et 4,65% qui correspondent respectivement aux fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41%. Ces résultats sont dans la gamme de valeurs obtenues par d'autres auteurs (voir tableau II).

En outre, la figure 13 représente une série de graphiques de la turbidité spécifique apparente (cf. fig. 2 dans Fragata et al, 1985) par unité de concentration de Chla incorporée dans les vésicules $T_{sp}(\text{Chla}) = T_a/[\text{Chla}]$, ou par unité de concentration de PC incorporée dans les vésicules $T_{sp}(\text{PC}) = T_a/[P_c]$ où T_a est la turbidité apparente définie plus haut. La figure confirme cette hypothèse de dimension homogène des vésicules dans les fractions éluées 37 à 42. En effet, on observe que, pour les fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41% de Chla , T_{sp} a tendance à se stabiliser.

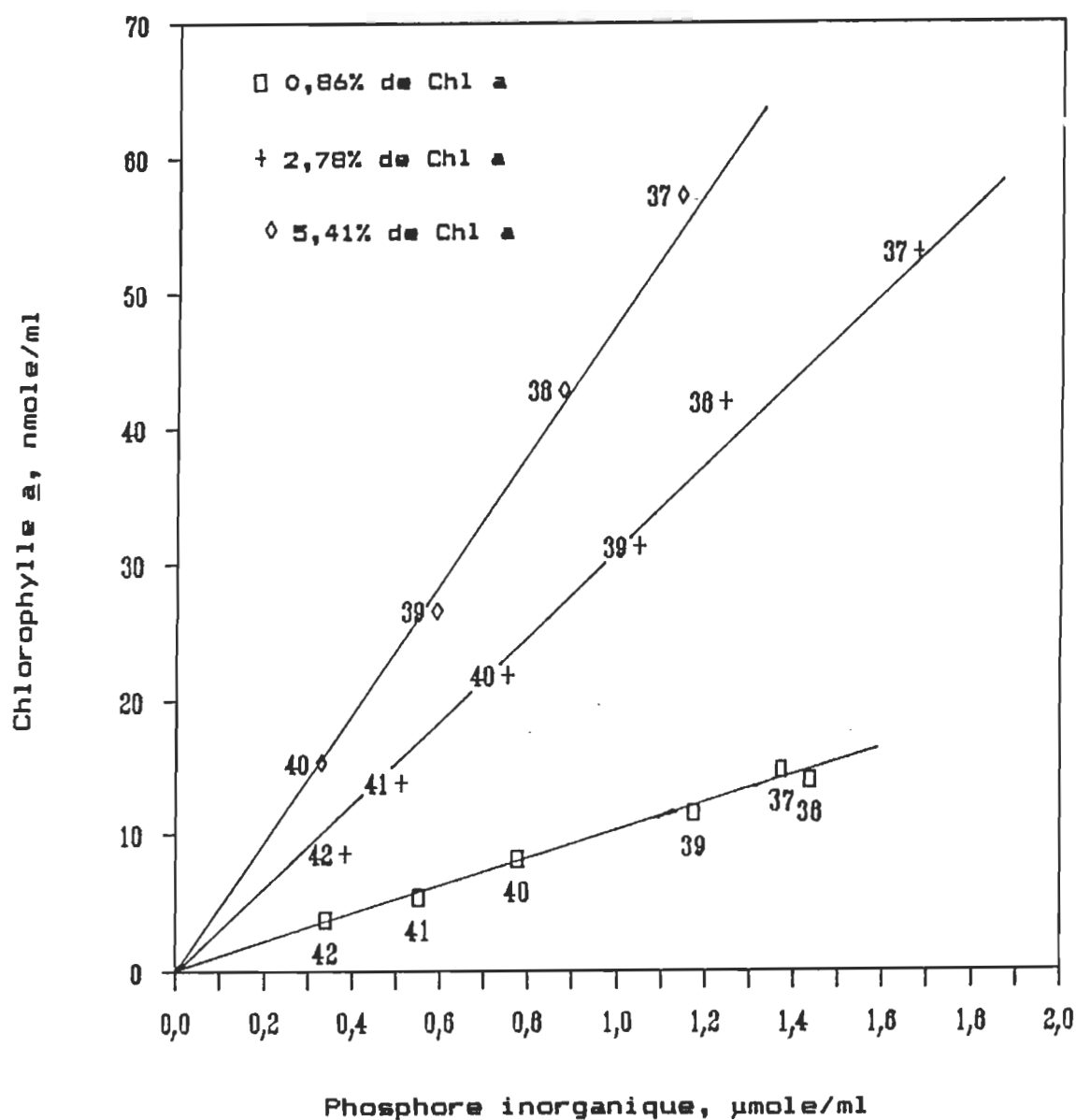


Figure 12. Concentration en Chl a vs concentration en P_i pour les tubes 37 à 42 éluées à partir d'échantillons de vésicules mixtes PC/Chl a préparés aux fractions molaires initiales 0,86 , 2,78 et 5,41% de Chl a.

Tableau II : Composition molaire d'amphiphiles à chaîne isoprène dans la bicouche d'une petite vésicule lipidique unilamellaire.

Rapport molaire initial critique(1)	Rapport molaire final maximum(2)	Sources
SH/PC = 1/10	1/4	Huang et al, 1970
Chol/PC = 1/5	1/3	Newman et Huang, 1975
Chl _a /PC = 1/33	1/55	Ritt et Walz, 1976
= Non mentionné	1/30	Stillwell et al, 1977
= 1/50	1/11	Dijkmans et al, 1979b
= 1/39	1/22	Ce travail
α-Toc/PC = 1/21	1/32	Bellemare et Fragata, 1981
Co-Q ₁₀ /PC = 1/20	1/10	Sunamoto et al, 1983

- 1: Rapport auquel soient les caractéristiques des vésicules, soit le comportement de l'inclusion de l'amphiphile manifestent un changement.
 2: Nombre maximum d'amphiphiles qu'une petite vésicule unilamellaire peut solubiliser.

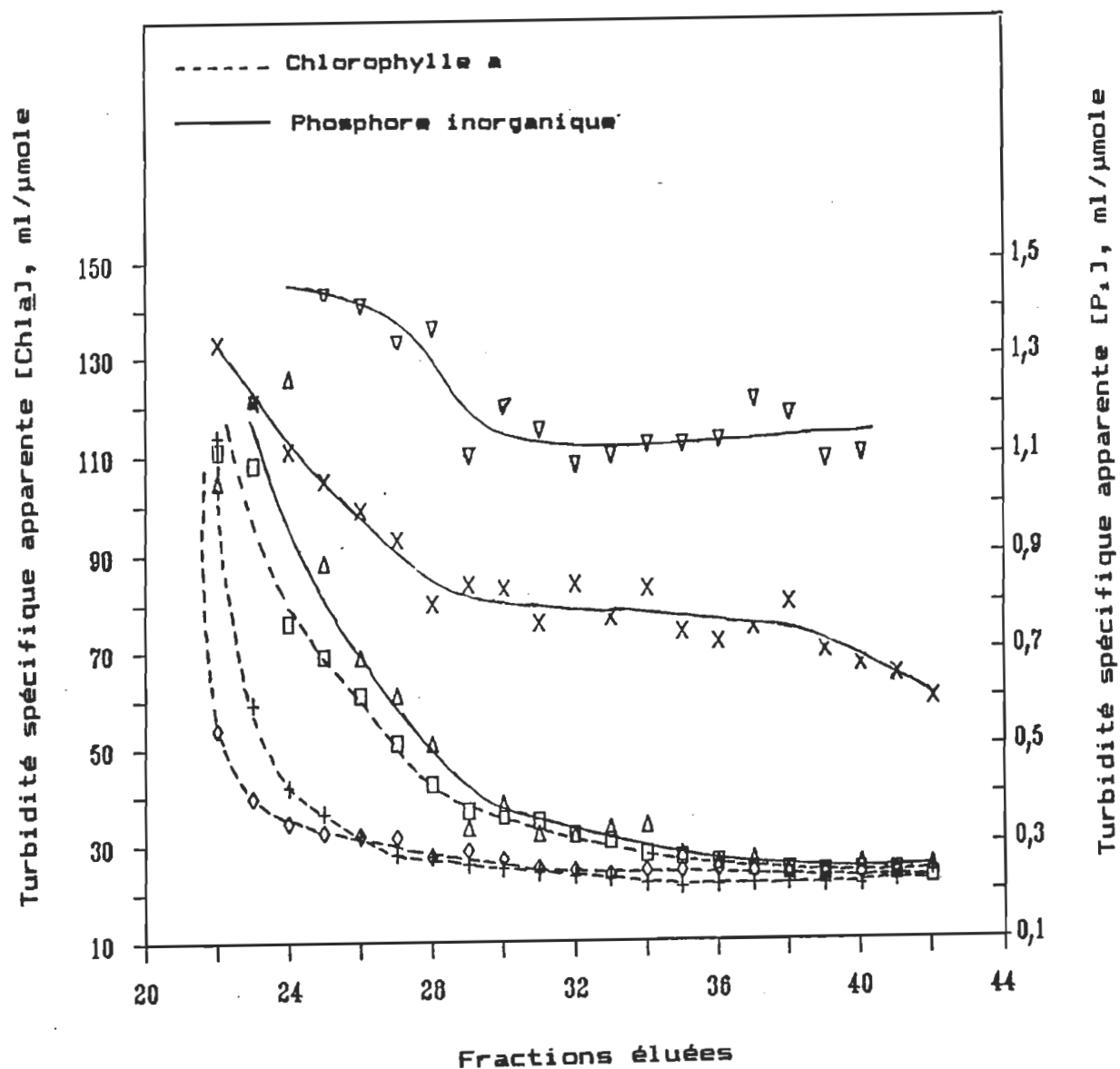


Figure 13. Profils de turbidité spécifique apparente des vésicules mixtes PC/Chla préparées à partir des fractions molaires initiales: 0,86 (,), 2,78 (,) et 5,41% (,) de Chla (d'après fig. 2 dans Fragata et al, 1985).

II.3.2. Mode d'incorporation de la Chla

Une étude plus détaillée de la turbidité spécifique apparente est donnée dans la figure 14. On voit que T_{sp} est indépendante, ou très faiblement dépendante, de la concentration en PC mais elle dépend nettement de la teneur en Chla dans les vésicules et ce pour les solutions des tubes 37 à 42 constituées de vésicules de type III. Les résultats représentés dans la figure 15 (T_{sp} par rapport à $[P_i]$ vs fraction molaire finale de Chla) permettent, en outre, de déterminer la T_{sp} en absence de pigment dans le système lamellaire (extrapolation à fraction molaire 0,0% de Chla). On obtient ainsi des valeurs de l'ordre de 0,10 ml/ μ mole qui sont comparables donc à la valeur déterminée par Barenholz et al (1977), c'est-à-dire 0,05 ml/ μ mole, pour les vésicules de PC pure.

La figure 15 montre, d'un autre côté, qu'aux alentours d'une fraction molaire finale de 4,5% de Chla, T_{sp} augmente brusquement. Cette transition à température constante n'est pas facile à expliquer. De prime abord, on pourrait conclure, comme l'ont fait avant d'autres auteurs (Dijkmans et al, 1979b), que l'augmentation de la concentration finale de Chla dans le système lamellaire serait à l'origine de l'augmentation du nombre de molécules de lipides par vésicule. Cependant, cette interprétation n'est pas à l'abri de toute critique. En effet, la turbidité est fonction aussi de la dimension des particules et une augmentation dans sa valeur signifierait qu'à cette gamme de concentrations de Chla incluse, la

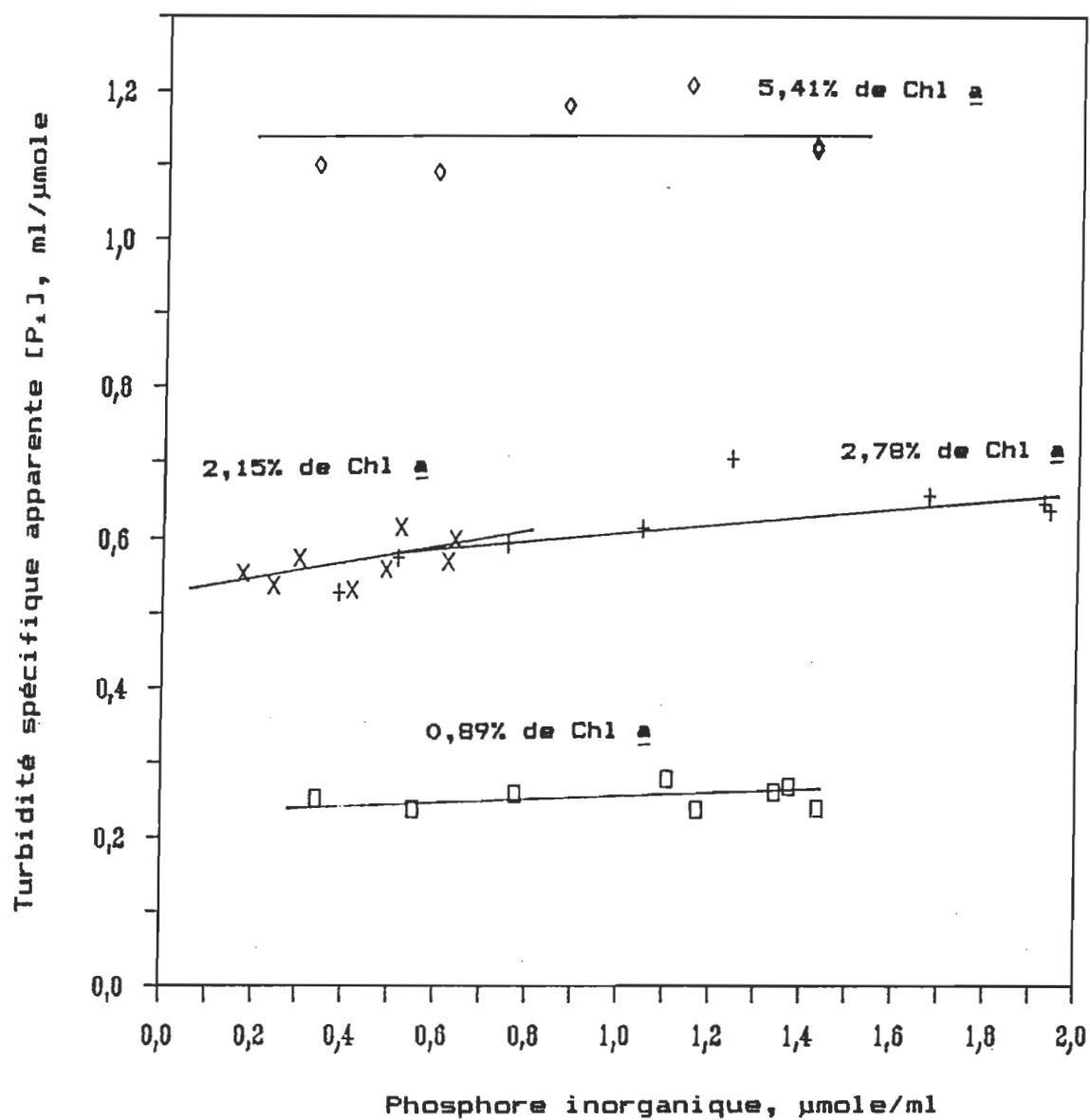


Figure 14. Turbidité spécifique apparente des fractions 37 à 42 (cf. fig. 11) en fonction de la concentration de P_i pour quelques fractions molaires initiales de Chl \underline{a} .

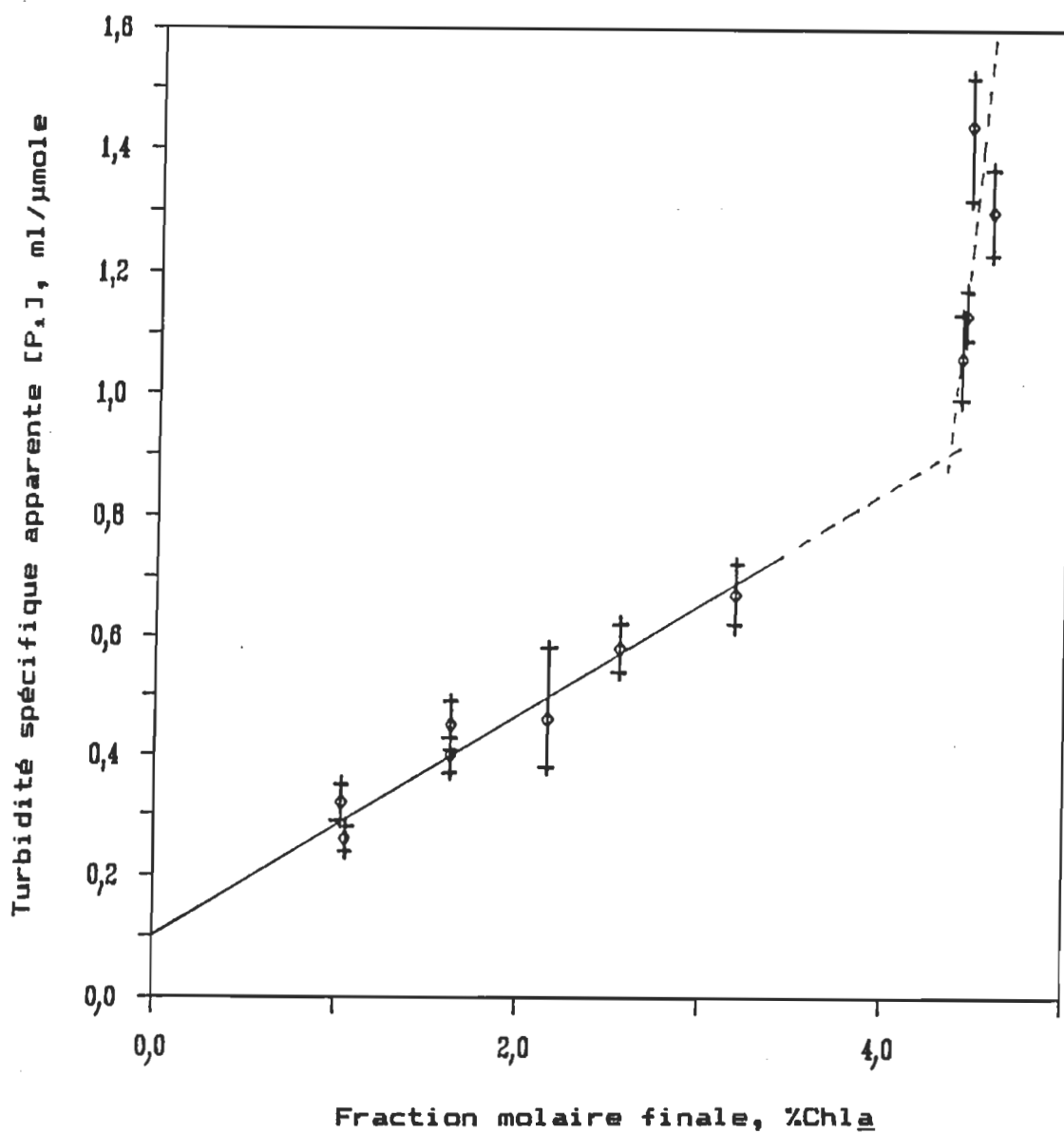


Figure 15. Turbidité spécifique apparente ($[P_1]$) en fonction de la proportion de Chl_a incorporée dans les vésicules unilamellaires de PC. Les points expérimentaux sont les valeurs moyennes des droites T_{sp} vs $[P_1]$ présentées en partie dans la figure 14.

vésicule est plus large. Newman et Huang (1975) ont remarqué le même phénomène (particule plus large) lorsque la fraction molaire de cholestérol dépasse 22%. À ce propos, Ritt et Walz (1976) proposent l'hypothèse de "séparation de phase" (cf. leurs pp 45-46) à température constante. Il s'agirait donc de réarrangement des molécules de PC et de Chla qui constituent la couche bilipidique. Cette question est à l'étude (M. Fragata, F. Bellemare, G. L'Heureux et M. El-Kindi, en préparation).

Il est à signaler, finalement, que la transition observée dans la figure 15 est confirmée par d'autres résultats (cf. fig. 16 et 17). Dans la figure 16, on représente l'inclusion de la Chla dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires. On voit que jusqu'à une fraction molaire initiale d'environ 2,5%, l'incorporation de la Chla est une fonction linéaire du mélange initial. La droite passe par l'origine et a une pente, déterminée par la méthode de la régression linéaire, de 1,2 et un coefficient de corrélation égal à 0,994. Cependant, au delà de cette fraction molaire la courbe atteint un palier pour augmenter ensuite. Ceci est aussi constaté dans la figure 17 où le rapport final/initial est tracé en fonction du mélange initial. Jusqu'à une fraction molaire initiale de 2,5% de Chla, ce rapport est sensiblement constant et peut être l'équivalent de la pente de la droite tracée à la figure 16. À partir de 3%, il baisse de 1,2 à 0,8 et semble se stabiliser après une fraction molaire initiale de 4% de Chla.

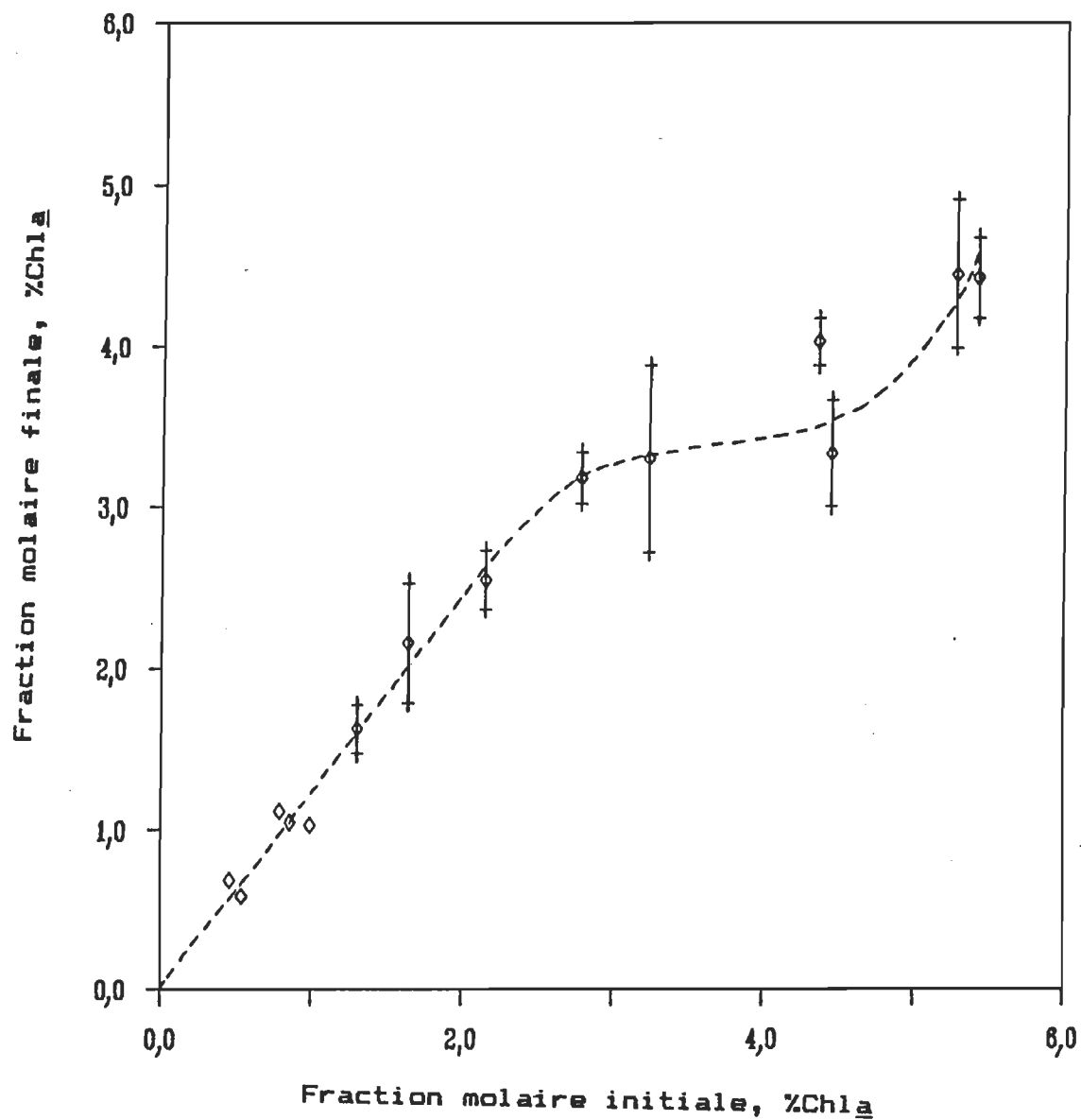


Figure 16. Comportement de l'incorporation de la Chla dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires en fonction du mélange initial de la PC avec la Chla.

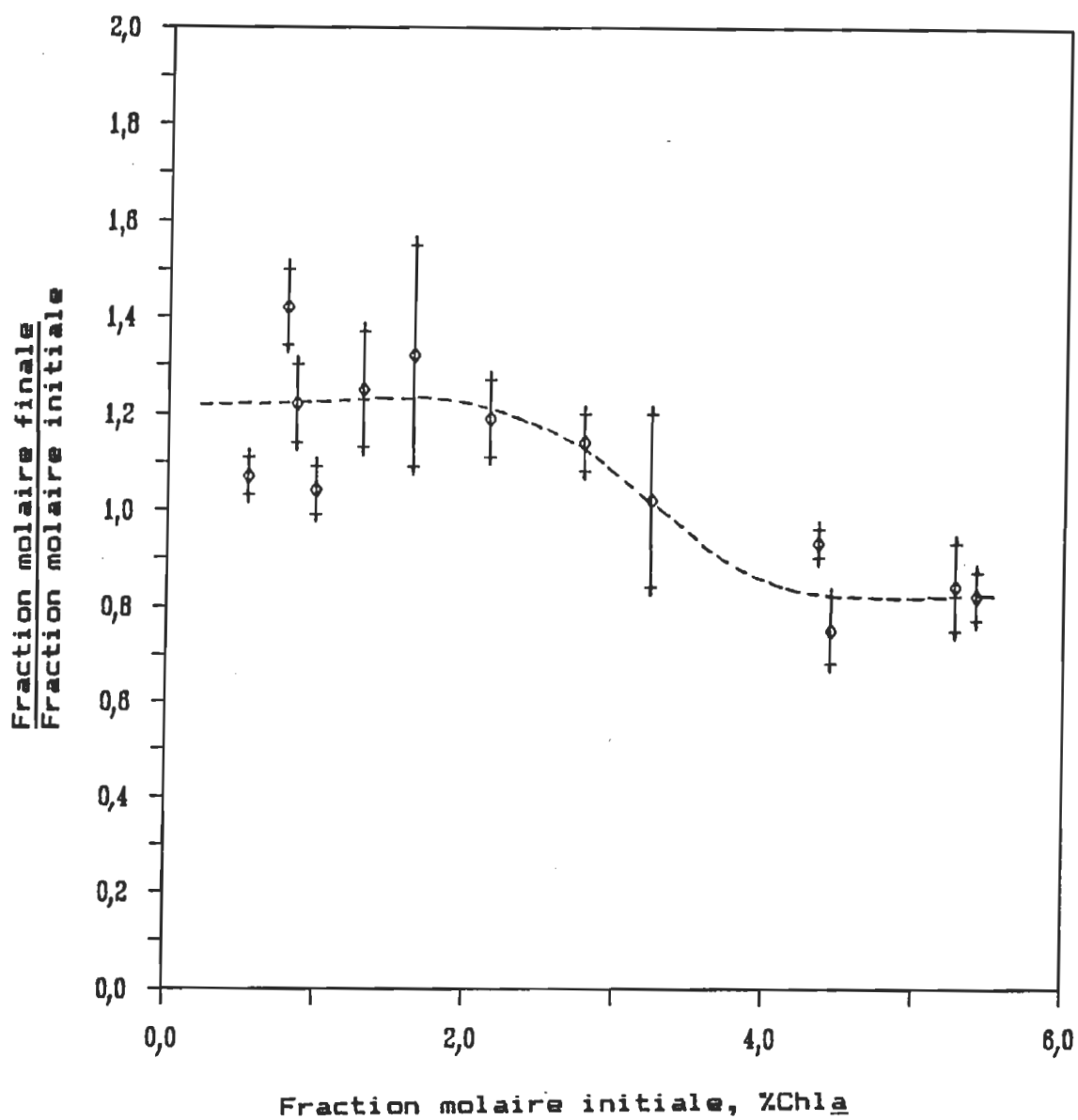


Figure 17. Rapport final/initial en fonction de la fraction molaire initiale de la Chla incluse dans des vésicules lipidiques unilamellaires.

II.4. DISCUSSION

Il se dégage essentiellement de cette étude que l'inclusion de la Chl_a dans la bicouche des vésicules unilamellaires de PC préparées par la méthode de la sonication a un comportement linéaire jusqu'à une fraction molaire initiale de 2,5% de Chl_a. C'est-à-dire, on constate une équivalence d'à peu près 1 à 1 entre les fractions molaires finales et initiales de Chl_a. D'ailleurs, cette question d'équivalence a été mentionnée par Dijkmans et al (1979a) qui ont trouvé un rapport final identique au rapport initial lors d'une étude sur les caractéristiques des vésicules lipidiques contenant la Chl_a. Ces dernières ont été préparées par la méthode de l'injection à l'éthanol (Batzri et Korn, 1973). D'autre part, Newman et Huang (1975) ont eux aussi constaté cette équivalence unitaire entre les rapports molaires final et initial dans le cas des vésicules incorporant le cholestérol. Il semblerait donc que ce mode d'incorporation est typique des mélanges d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée dans des couches bilipidiques constituées de lipides à deux chaînes carbonées (M. Fragata, F. Bellemare, G. L'Heureux et M. El-Kindi, en préparation).

Par contre, à des fractions molaires initiales élevées (> 3,0%), on assiste à un autre comportement de l'inclusion. Il s'agit de l'observation de la "transition de phase" à température constante dont nous avons parlé plus haut (voir fig. 15, 16 et 17). Cette "transition de phase" peut être

expliquée par une agrégation des vésicules, mais il est aussi important de considérer la possibilité de changements structuraux à l'intérieur même de la couche bilipidique.

Tel que Dijkmans et al (1979b), nous avons également remarqué que les profils d'élution des différentes préparations de vésicules, obtenus après fractionnement des vésicules sur gel de sépharose 4-B, sont identiques. Ceci semble indiquer que l'incorporation de la Chla n'a pas d'effet sur la dimension d'une petite vésicule unilamellaire. Cependant, d'après Ritt et Walz (1976) qui ont utilisé la méthode de filtration sur gel de sépharose 4-B, cette inclusion de la Chla provoquerait une diminution du rayon moyen de Stokes des vésicules mixtes de près de 1 nm relativement à celui d'une vésicule préparée à partir de la PC pure. Ces deux auteurs ont interprété cette baisse du rayon comme la preuve de l'existence d'une certaine interaction entre le pigment et les phospholipides qui composent la particule. Cette interaction Chla-lipides a, en effet, été bien établie dans une étude, à l'aide de la méthode de la résonance magnétique nucléaire, de couches bilipidiques contenant Chla et DSPC (Chan et al, 1979; cf. en particulier leur fig. 13). Ceci laisse supposer l'existence de mécanismes complexes de mouvements moléculaires permettant à la vésicule unilamellaire de donner origine à des arrangements moléculaires divers (voir discussion dans Ritt et Walz, 1976).

Chapitre III

INCORPORATION DE LA STÉARYLAMINE DANS LES VÉSICULES UNILAMELLAIRES DE PHOSPHATIDYLCHOLINE

III.1. INTRODUCTION

En pharmacologie, les liposomes sont utilisés comme véhicules de substances biologiques (drogues, hormones, antibiotiques, etc.), et leur comportement a été étudié (pour une revue générale voir e.g. Gregoriadis, 1976a et 1976b). D'une part, afin de diriger ces véhicules d'agents actifs vers des tissus bien spécifiques, la surface liposomale devient un facteur important dans l'interaction des vésicules avec les membranes des cellules vivantes (Jonah et al, 1975 et Poste et Papahadjopoulos, 1978). D'autre part, la charge de surface des membranes dépend de la composition lipidique (Jansons et al, 1978). Par exemple, des vésicules mixtes PC/PS, PC/PA et PC/PI ont une densité de charge de surface négative tandis que des vésicules mixtes PC/SAM ont une densité de charge positive (voir fig. 18). Ainsi, un ajustement de la composition lipidique des vésicules modifie l'affinité de ces dernières envers certains types de cellules vivantes; e.g., des vésicules chargées positivement, par inclusion de la SAM, sont 20 fois plus attirées (adsorbées) par des cellules vivantes que des vésicules neutres ou chargées négativement par la PS (Jansons et al, 1978). Mentionnons encore que la SAM a été utilisée dans la fixation des protéines sur des vésicules lipidiques (Helmkamp, 1980, Leung, 1980 et Fragata et al, 1984).

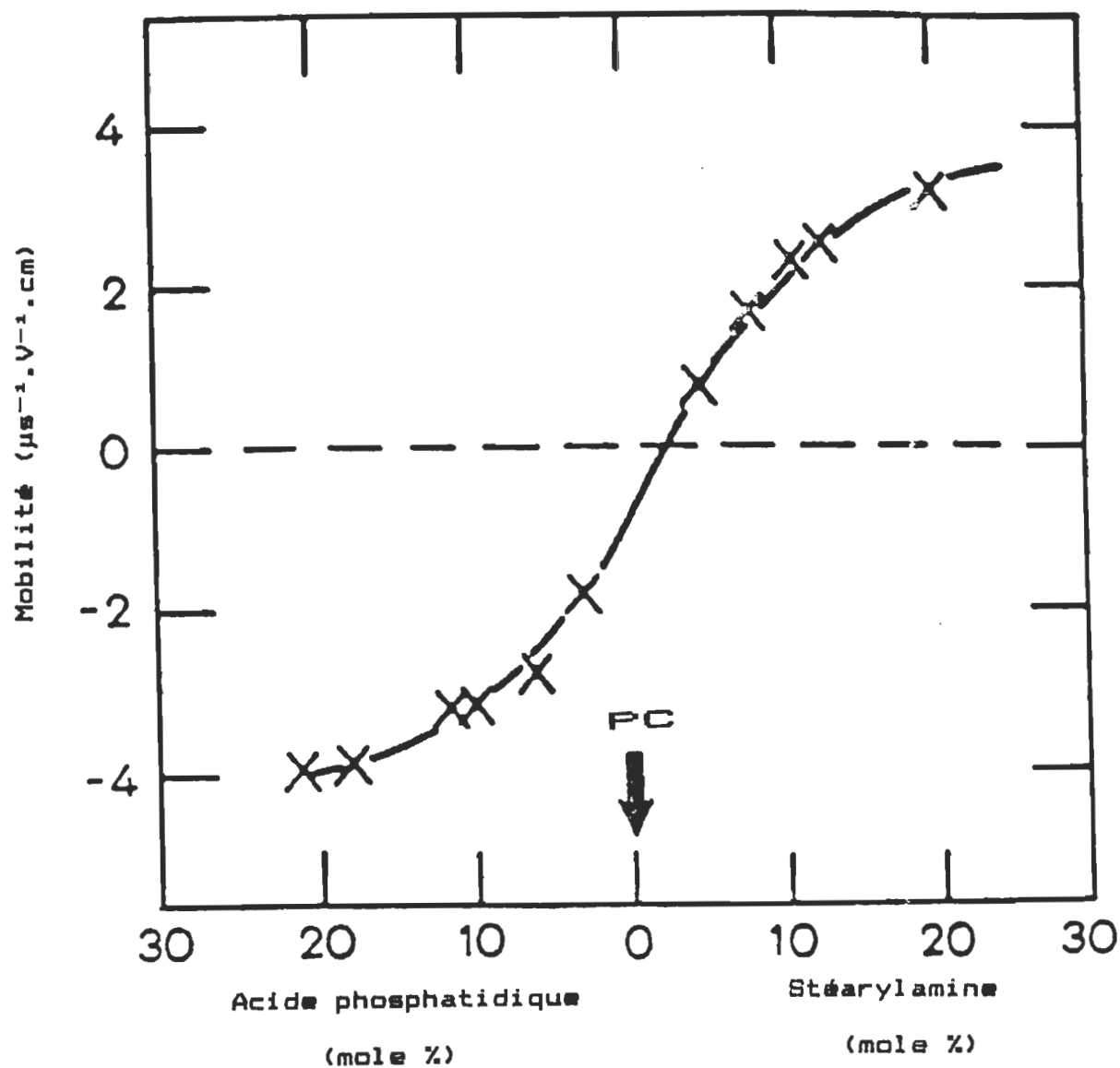


Figure 18. Mobilité électrophorétique de vésicules contenant l'acide phosphatidique (PA) et la stéarylamine (SAM) (d'après fig. 2b dans Wirtz et al, 1976).

L'inclusion de la stéarylamine dans des bicouches lipidiques pose, cependant, certains problèmes d'ordre structural (voir discussion dans sous-chapitre 1.2.). En effet, on peut s'attendre à une destruction possible des couches bilipidiques si la concentration relative finale SAM/PC dépasse certaines limites. Ceci fait l'objet de l'étude décrite ci-dessous.

III.2. PROCÉDURES EXPÉRIMENTALES

III.2.1. Préparation des vésicules mixtes PC/SAM

La méthode est identique à celle de la préparation de vésicules mixtes contenant la PC et la Chla (voir schéma 1). La seule modification concerne le tampon Borate 0,2 M (pH = 8,5) qui remplace le tampon Tris-HCl vu que nous avons utilisé la méthode de Litman (1973) décrite ci-dessous.

III.2.2. Détermination de la concentration de la PC

La procédure est la même que pour la détermination de la concentration de la PC dans le cas des vésicules mixtes incorporant la Chla (voir section II.2.3).

III.2.3. Détermination de la concentration de la SAM

III.2.3.1. Réaction du TNBS avec les α -amines

L'action du trinitrobenzène sulfonate (TNBS) sur les amines donne naissance et aux dérivés picramides et à l'ion sulfite (SO_3^{-2}) lesquels par la suite se combinent pour former un complexe (schéma 2a). Goldfarb (1966) avait noté qu'une mole d'une trinitrophényl-amine (TNP-amine) réagit avec une mole de SO_3^{-2} pour former le complexe. La présence de ce

dernier, en tant que produit de la trinitrophénylation, a été confirmée par l'acidification de la solution du mélange qui donne un spectre d'absorption identique à celui d'une TNP-amine purifiée. Ainsi on peut contrer la formation du complexe TNP-amine- SO_3^{-2} soit par une acidification soit par tout autre moyen qui diminuerait la concentration de l'ion sulfite (Goldfarb, 1966 et Fields, 1971).

Means et al (1972) proposent le mécanisme sur le schéma 2b où B est une base, soit l'ion OH^- , un tampon ou une autre amine, et HB^+ est l'acide conjugué correspondant. Par ailleurs, ils ont constaté que le taux de réaction observé dépend du taux de formation de l'intermédiaire (i.e., k_1) et de l'équilibre k_2/k_{-2} lequel contrôlerait la décomposition de cet intermédiaire par deux chemins alternatifs avec des constantes de réaction k_3 et k_{-1} .

Le TNBS peut devenir non réactif quand il réagit avec l'ion OH^- puisqu'il se transforme en une espèce trianionique (schéma 2c). De plus sa réaction avec les groupements thiols est 30 à 50 fois plus rapide que celle avec les α -amines (Fields, 1971). Ainsi, il faut prendre garde lorsque l'on étudie la distribution des amino-phospholipides dans la membrane des cellules car celles-ci contiennent des composés avec des groupements thiols (Haest et al, 1981).

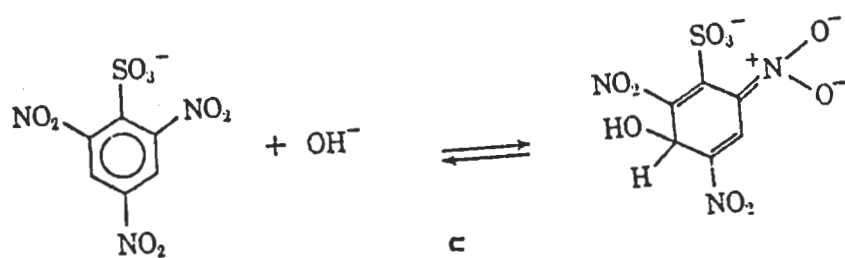
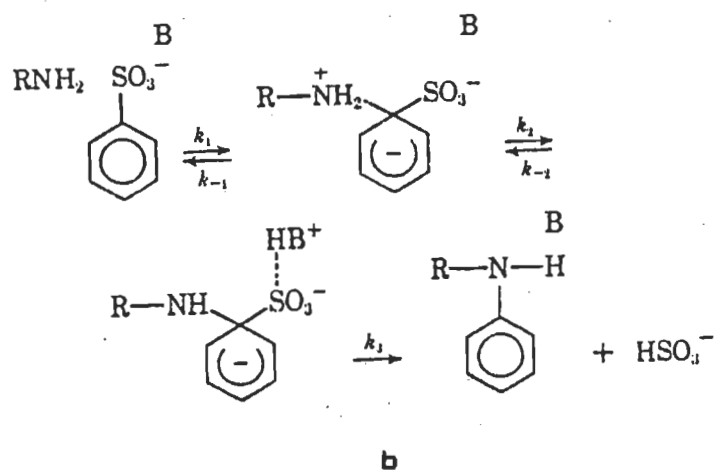
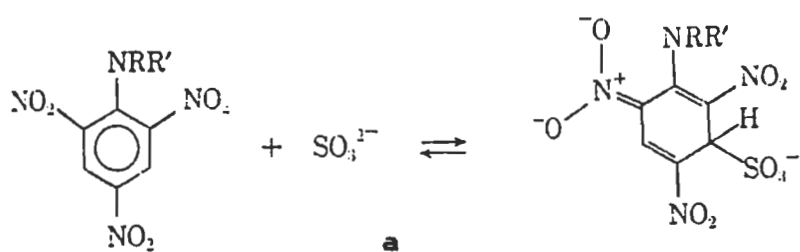


Schéma 2. Réaction du TNBS avec les α -amines en solution aqueuse
(d'après Means et al, 1972).

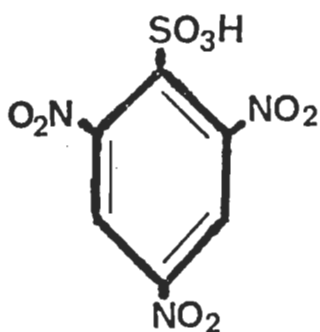
III.2.3.2. Dosage de la SAM par le TNBS

La concentration de la SAM est obtenue à partir d'un procédé de dosage des amines primaires par action du trinitrobenzène sulfonate (TNBS). La méthode est celle de Litman (1973) qui a été modifiée. Ainsi, à 1,0 ml de chaque fraction renfermant des vésicules mixtes PC/SAM, on ajoute 1,0 ml de tampon borate à 50% éthanol (pH = 8,5). Pour la quantité de SAM sur la monocouche externe, on ajoute seulement 1,0 ml de tampon borate pure. Après une forte agitation du mélange à l'aide du vortex, on injecte, dans un cas (dosage total) comme dans l'autre (dosage externe), 0,1 ml d'une solution de TNBS à 2,0%.

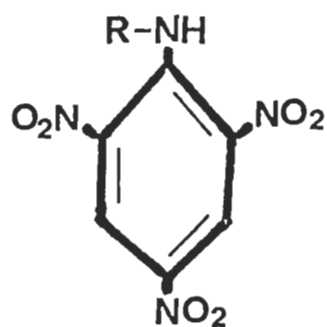
Ensuite, on garde le tout dans une obscurité totale pendant deux heures, c'est-à-dire le temps nécessaire pour permettre à la réaction de se rendre à son terme. Après quoi, on ajoute 2,0 ml d'une solution de HCl 0,5 N à 50% éthanol pour empêcher la combinaison de l'ion sulfite avec la TNP-SAM (fig. 19). Finalement, on prend la densité optique à 410 nm, et elle sera comparée à une courbe standard d'une solution de SAM dont la pente est égale à 1,3 ml/ μ mole dans les conditions de nos expériences.



Stéarylamine



TNBS



Trinitrophényl-stéarylamine

Figure 19. Structures chimiques de la SAM, du TNBS et produit de la réaction de la trinitrophénylation de la SAM.

III.3. RÉSULTATS

III.3.1. Caractéristiques des vésicules mixtes PC/SAM

Le profil d'élution d'une dispersion renfermant des vésicules mixtes préparées avec la PC et la SAM, à une fraction molaire initiale de 0,92% de SAM, est montré à la figure 20. Cette dispersion, qui est obtenue par la même procédure que celle de la PC avec la Chla, présente deux types de particules: une population composée de larges vésicules multilamellaires (type I), l'autre population renferme des petites vésicules unilamellaires (type III) dont le pic sur le profil d'élution est pratiquement symétrique. Ceci n'était pas le cas pour des vésicules incorporant la Chla (voir fig. 9).

À la figure 21, on voit clairement que l'absorbance pour des vésicules du type III est proportionnelle et à la concentration de la PC et à la concentration de la SAM. Ceci est une confirmation que les tubes, dont le numéro varie de 31 à 37, contiennent des vésicules d'une dimension homogène si nous nous basons sur ce que Huang (1969) a déduit lorsqu'il a caractérisé les vésicules préparées par la méthode de la sonication (voir remarques dans section II.3.1.). En outre, la figure 22 met en évidence la proportionnalité entre la quantité de SAM incluse et la quantité de PC

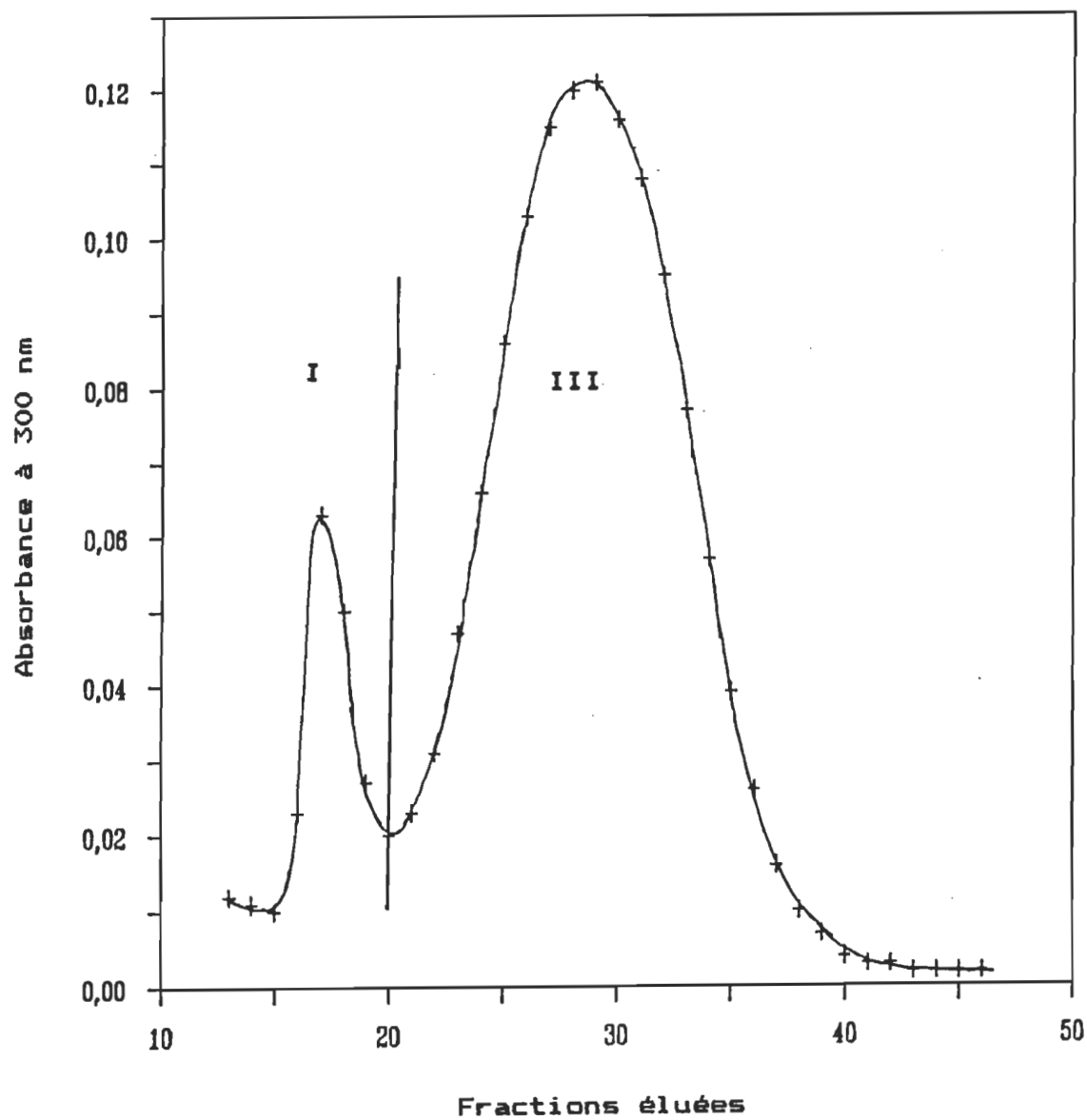


Figure 20. Profil d'élution d'une dispersion de vésicules mixtes préparées à partir de la phosphatidylcholine et de la stéarylamine. Le mélange binaire initial est de 0,92% de SAM et est dispersé, par la méthode de la sonication, dans un tampon borate 0,2 M (pH = 8,5).

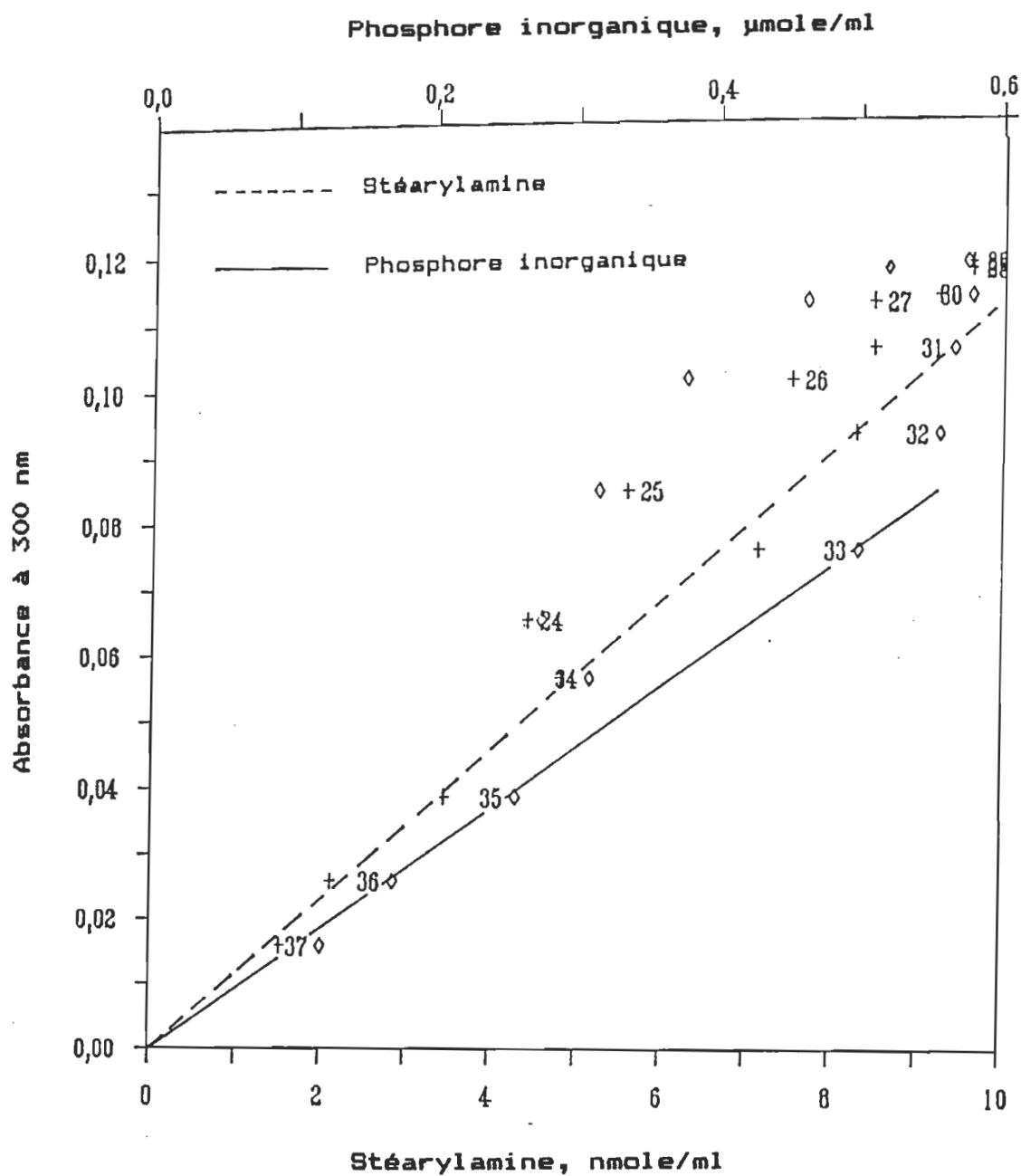


Figure 21. Absorbance à 300 nm des vésicules lipidiques contenant la SAM en fonction de la concentration du phosphore inorganique et de la concentration de la stéarylamine. Le mélange binaire initial est de 0,92% de SAM.

dans les vésicules préparées à partir du mélange binaire PC/SAM à une fraction molaire initiale de 0,92% de SAM. Par conséquent, la SAM est parfaitement dispersée dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires à ces fractions molaires ou à des fractions molaires inférieures. Les nombres adjacents à la droite sont les numéros des fractions éluées mentionnées sur la figure 20. Cette droite est obtenue par la méthode de la régression linéaire avec un coefficient de corrélation de 0,997.

Dans la figure 23, nous étudions l'effet des concentrations relatives sur la taille des vésicules. À titre d'exemple, la figure représente les résultats obtenus avec des fractions molaires initiales de 0,92 , 1,23 , 3,57 et 6,66% de SAM. Mentionnons, tout d'abord, qu'il a été nécessaire de calibrer les colonnes de gel sépharose 4-B afin d'assurer une comparaison raisonnable des profils d'élution. Les colonnes ont été calibrées avec du chromate de potassium en absence de vésicules vu que cette substance peut interagir avec les lipides (F. Bellemare, communication personnelle). En partant de l'hypothèse qu'il n'y a pas eu de variations ni dans l'état du gel de sépharose 4-B ni dans la vitesse de l'élution (vitesse de la pompe fixée à 1 ml/4 min), on peut considérer que les résultats décrits ci-dessous sont ainsi standardisés. On observe que pour une fraction molaire initiale de 1,23% de SAM, le pic du profil d'élution dû aux larges vésicules multilamellaires (fractions 13 à 17, fig. 23) s'est déplacé vers la fraction limite inférieure qui constitue le volume vide de la colonne. Ceci indique qu'il y a eu variation de la dimension des vésicules, vraisemblablement une augmentation de la taille.

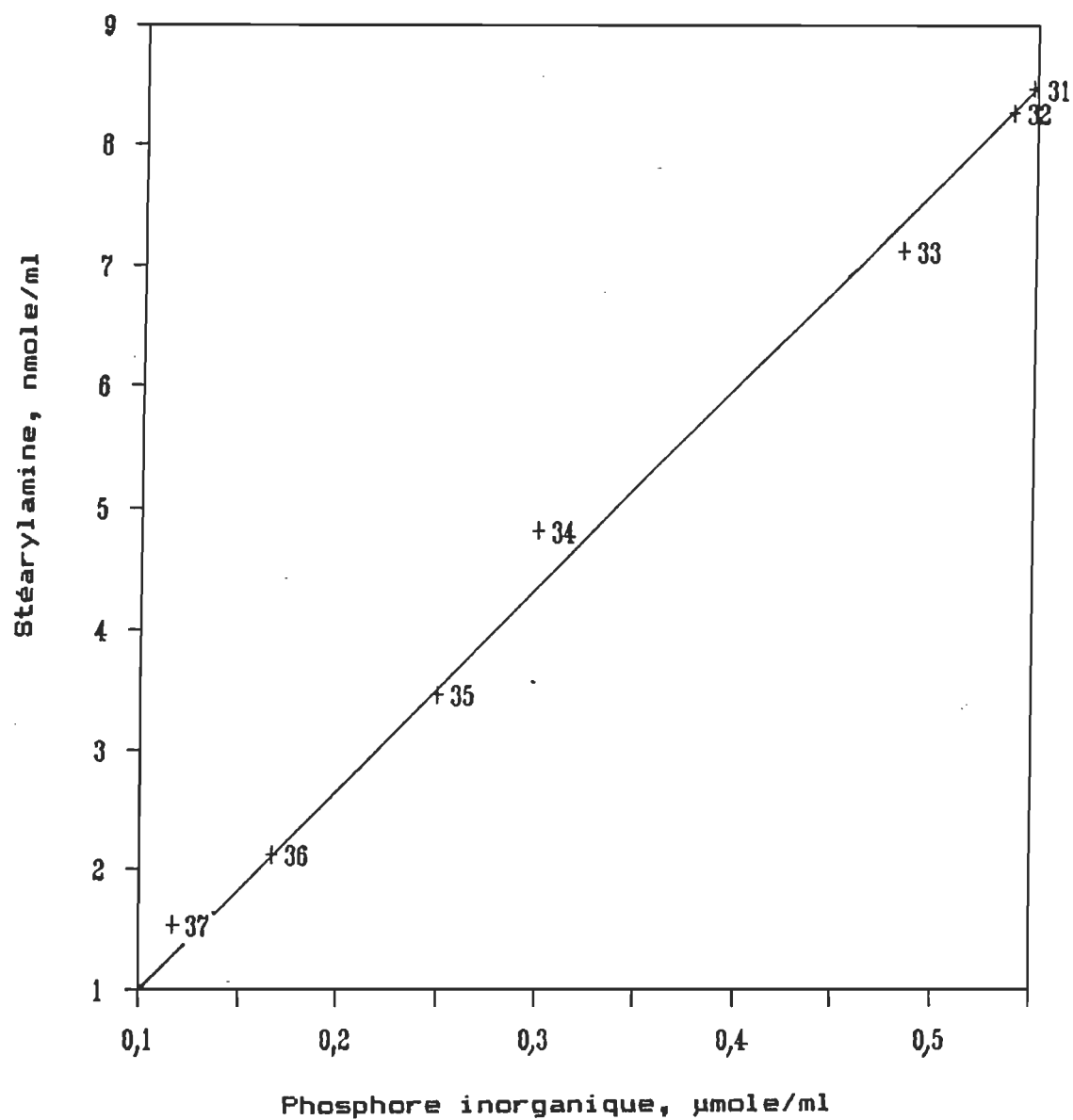


Figure 22. Concentration de la stéarylamine en fonction de la concentration du phosphore inorganique pour les tubes 31 à 37 pour l'échantillon préparé à la fraction molaire initiale de 0,92% de SAM.

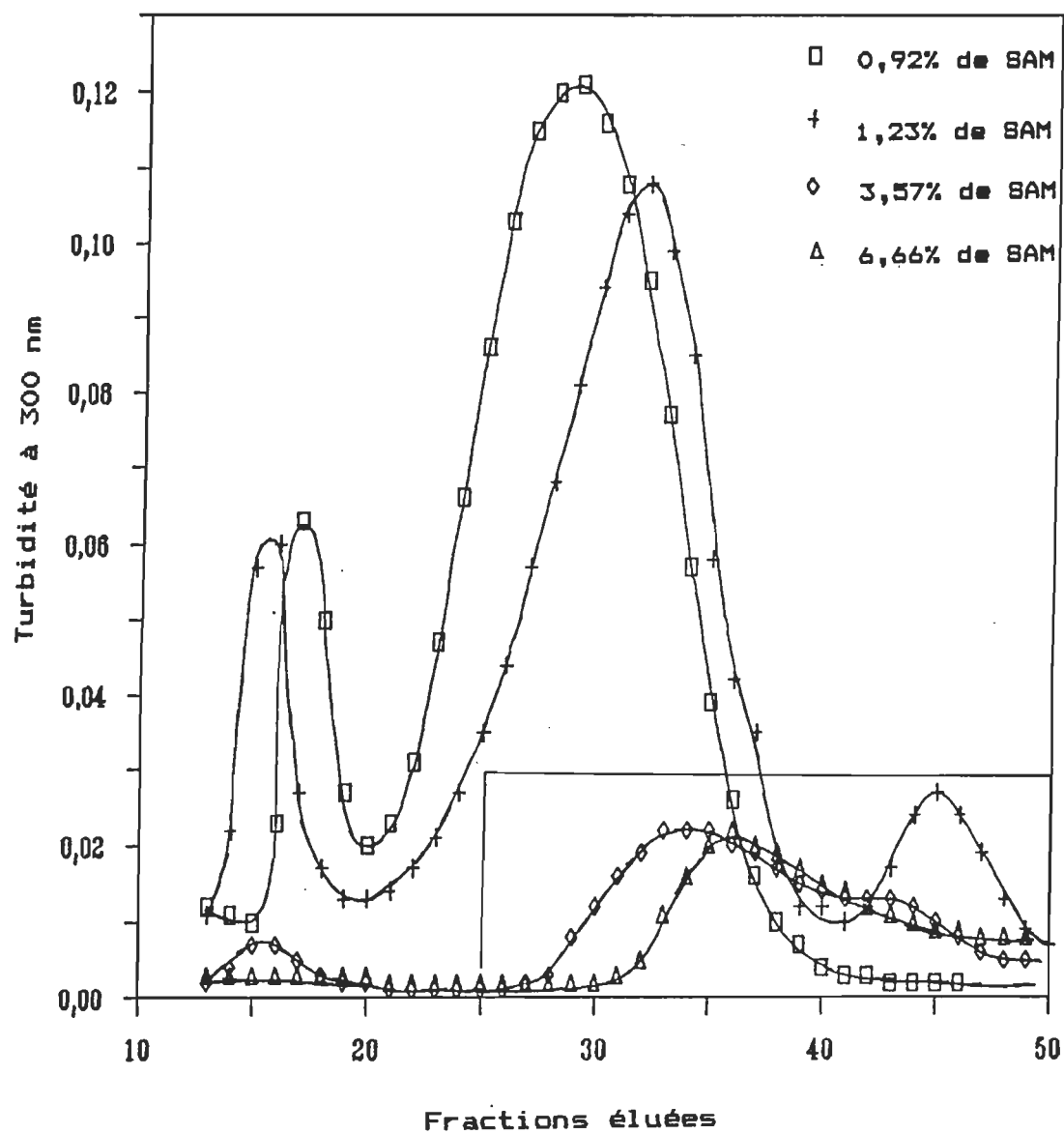


Figure 23. Série de profils d'élution de dispersions de vésicules mixtes préparées à partir de différentes fractions molaires initiales de SAM (voir agrandissement du rectangle à la figure 24).

Par contre, le pic du profil d'élution des petites vésicules unilamellaires (fractions 30 à 37, fig. 23) s'est déplacé vers la fraction limite supérieure, c'est-à-dire le volume final de la colonne. Ceci indique que cette population est formée de vésicules plus petites que celles dans la dispersion à 0.92% de SAM (cf. fig. 23). En augmentant la fraction molaire initiale de SAM dans le mélange, nous assistons à la disparition des grandes vésicules multilamellaires et à une transition des petites vésicules unilamellaires vers ce qui pourrait être des structures micellaires. Ceci devient plus évident dans la figure 24 qui est un agrandissement de la région comprenant les fractions 25 à 50 éluées de la colonne de gel de sépharose 4-B. Ainsi, à la fraction molaire initiale de 6,66% de SAM, nous constatons la formation de vésicules d'une dimension intermédiaire entre celle des petites vésicules unilamellaires et celle de structures micellaires. En effet, il a été montré à plusieurs reprises (Panzner et Jansons, 1979 et Schmidt, 1983) que la présence de structures micellaires est décelable par leur élution des colonnes de chromatographie avec les dernières fractions (volume vide). Ceci a été vérifié dans nos expériences (cf. fig. 23 et 24).

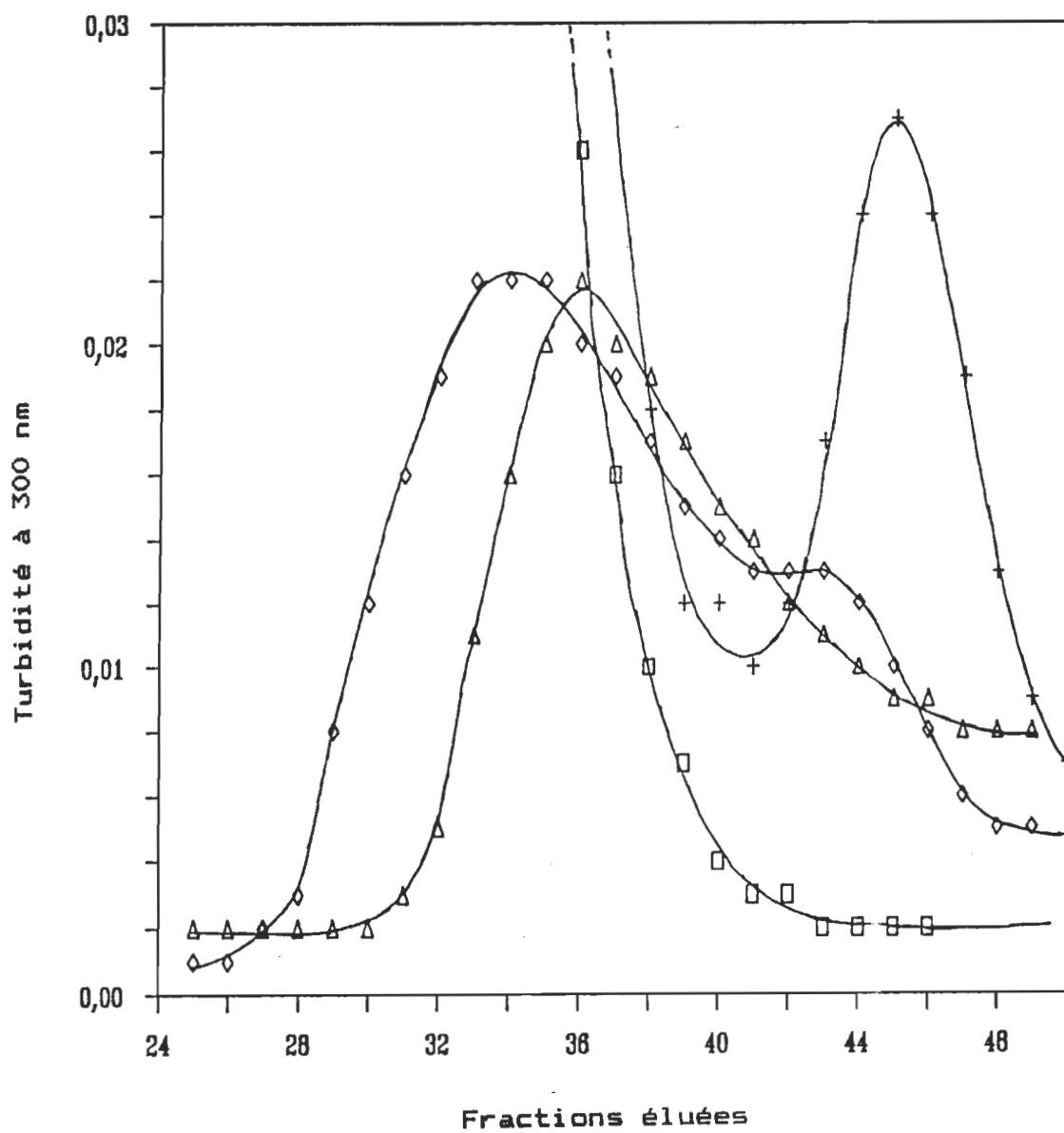


Figure 24. Agrandissement de la région délimitée dans la figure 23. La signification des symboles est donnée dans la figure 23.

III.3.2. Mode d'inclusion de la SAM

La figure 25 représente la variation de la fraction molaire de SAM incorporée dans les vésicules (fractions 31 à 37 éluées de la colonne de sépharose 4-B) en fonction du mélange initial. On voit que jusqu'à une fraction molaire initiale de SAM d'environ 2,0%, l'inclusion de cet amphiphile semble suivre un comportement linéaire dont le coefficient de corrélation est égal à 0,971. Au delà de 3,0%, le mélange final se comporte d'une façon sigmoïdale et il est plus grand que le mélange initial dans les différentes préparations des dispersions. Ceci a été déjà observé par Panzner et Jansons (1979). Nous interprétons la courbe obtenue après fractions molaires initiales supérieures à 2% comme étant due à des formations de structures micellaires. La présente étude ne permet pas, cependant, de confirmer cette hypothèse. Cela fera l'objet de travaux ultérieurs. On peut toutefois ajouter que nos conclusions vont dans la ligne de celles rapportées par Panzner et Jansons (1979), qui eux aussi ont travaillé avec des mélanges lipidiques contenant de la PC et de la SAM. En ce qui concerne la quantité de SAM incorporé sur la face externe de la vésicule, on vérifie (fig. 26) que le rapport externe/total atteint un maximum (84%) pour les fractions molaires initiales aux alentours de 5%. Il s'ensuit une baisse au fur et à mesure que la proportion de la SAM est augmentée dans le mélange initial avec la PC. La discussion de ces observations, en rapport avec des travaux d'autres auteurs, sera faite dans le chapitre IV (Discussion générale).

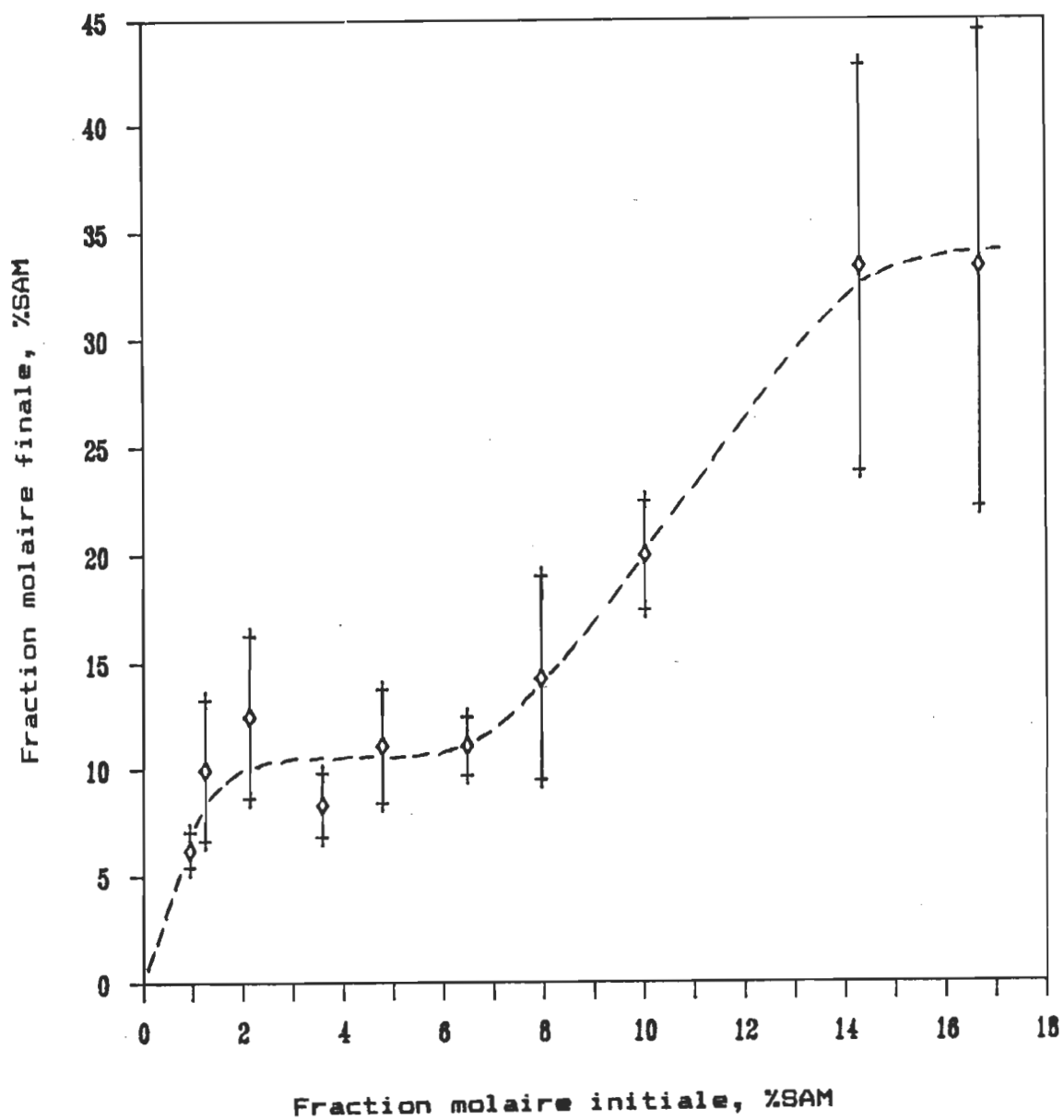


Figure 25. Comportement de l'inclusion de la SAM dans la bicouche lipidique des vésicules unilamellaires en fonction du mélange binaire initial de la PC avec la SAM. Fractions 31 à 37 éluées de la colonne de sépharose 4-B.

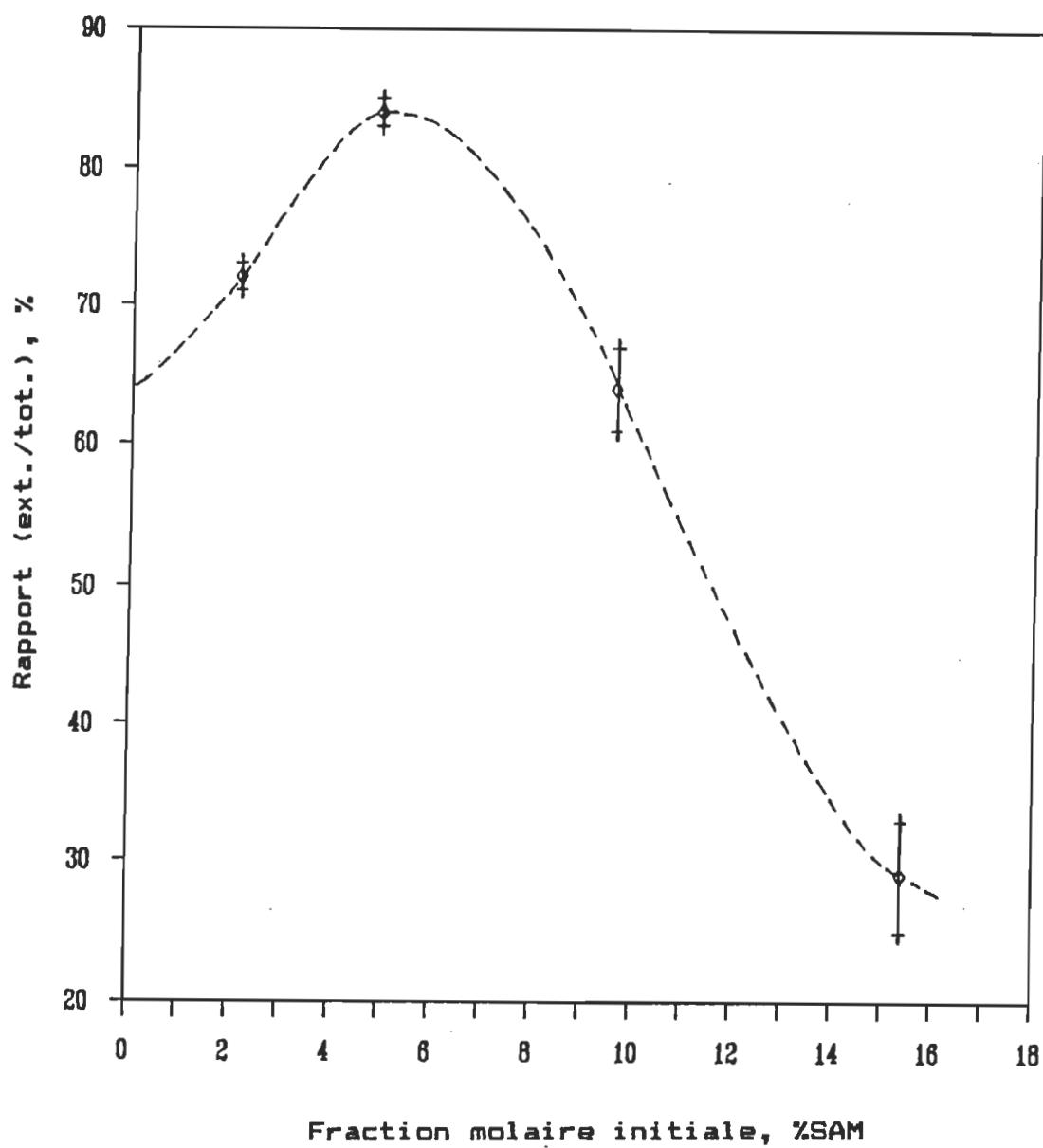


Figure 26. Rapport externe/total pour la SAM dans les vésicules lipidiques en fonction du mélange binaire initial de la PC avec la SAM. Fractions 31 à 37 éluées de la colonne de sépharose 4-B.

III.4. DISCUSSION

La première constatation qui doit être retenue, dans cette étude de l'incorporation de la SAM dans des vésicules lipidiques unilamellaires, est la suivante: la SAM, un amphiphile contenant une seule chaîne aliphatique de 18 atomes de carbone et une tête polaire constituée d'une amine primaire, n'est pas dispersée idéalement dans la bicouche lipidique d'une vésicule. Les profils d'élution des différentes dispersions, obtenues après fractionnement des particules sur le sépharose 4-B, démontrent que l'inclusion de la SAM a un effet très marqué sur la dimension d'une vésicule lipidique. Ceci va dans le même sens que les travaux de Deleers et al (1982a) qui ont constaté que la SAM augmentait la température de transition de phase gel-cristal liquide de la DPPC lorsqu'ils ont effectué des mesures de densité optique et de calorimétrie différentielle à balayage sur des vésicules mixtes de DPPC/SAM = 6/1. Ils ont interprété cet effet comme une rigidification de la matrice lipidique et une formation de nouvelles structures liposomales plus larges. La présence de ces dernières a déjà été remarquée par Jansons et al (1978) à l'aide de la microscopie électronique. La question qui se pose maintenant est de savoir pourquoi le pic d'élution des vésicules plus larges n'apparaît pas sur le profil d'élution des dispersions de vésicules dont la fraction molaire initiale est de plus que 2,0% de SAM. Nous pouvons envisager deux hypothèses possibles:

(a) *premièrement*, s'il y a eu formation de vésicules lipidiques très larges comme l'affirment Jansons et al (1978) et Deleers et al (1982a), alors elles sont restées adsorbées sur le gel de sépharose 4-B (voir table 2 dans Sharma et al, 1977) et, donc, n'ont pas pu être éluées. À toutes fins pratiques, ceci pourrait nous expliquer pourquoi pendant quelques préparations de vésicules dont la proportion en SAM était élevée, les deux ou trois premières fractions éluées étaient très turbides (résultat non montré); et (b) *deuxièmement*, les larges vésicules sont peut être fractionnées et donnent naissance à des structures plus petites (effet soit-disant lytique). La SAM pourrait créer des espaces vides (trous) dans la bicouche lipidique que l'eau remplirait (Haydon et Taylor, 1963) et par la suite, la large vésicule se désintégrerait en structures plus petites. D'ailleurs, Eytan et Broza (1978) donnaient comme explication à l'inhibition de la cytochrome oxidase par la SAM, le fait que cette dernière exposerait la sous-unité hydrophobe de l'enzyme en détruisant le complexe enzyme-lipides de frontière qui pourrait s'incorporer dans les vésicules par phénomène de fusion.

D'après les figures 23 et 24, l'augmentation de la concentration de la SAM dans les vésicules conduit à la formation de structures nouvelles. La SAM pourrait se regrouper ("clusters") (Hausser et Guyer, 1979) en micelles inverses à l'intérieur d'une structure probablement hexagonale de la PC (Das et Ränd, 1984), et serait ainsi pour cette raison que le pourcentage de la SAM sur la face externe de la particule diminue à des fractions

molaires initiales élevées (voir fig. 26). On ne peut pas discuter de "transition de phase" proprement dite, comme pour le cas de la Chla (voir chapitre II), puisque l'on n'est pas sûr de l'existence des petites vésicules unilamellaires lorsque la proportion de SAM dans le mélange initial dépasse 2,0%.

Ainsi, le fait que des acides gras (ex. l'acide myristique) peuvent causer la fusion de liposomes (Kantor et Prestegard, 1978) ou que les lysolécithines peuvent avoir un effet lytique sur les vésicules (Mandersloot et al, 1975 et Morris et al, 1980), prouve que l'incorporation de molécules, dont la structure chimique est totalement différente de celle de la PC, peut modifier fondamentalement les propriétés physico-chimiques de la matrice solubilisante.

Chapitre IV

DISCUSSION GÉNÉRALE

IV.1. MÉLANGES CHLOROPHYLLE a - PHOSPHATIDYLCHOLINE

On a déduit au chapitre II que la Chla, à des fractions molaires initiales inférieures à 5%, n'a pas d'effet sur la dimension d'une petite vésicule unilamellaire préparée à partir de la PC du jaune d'oeuf. D'autre part, dans la gamme de fractions molaires initiales utilisées dans ce travail, cette chlorophylle est incorporée dans la bicouche lipidique de la vésicule. Nos résultats sont comparables à ceux obtenus dans d'autres études sur le même amphiphile (voir tableau II).

En outre, la méthode de préparation des vésicules mixtes n'influence probablement pas dans une grande mesure la quantité de Chla solubilisée dans la bicouche lipidique. Le système est dynamique et les molécules de lipides et d'additifs vont être engagées dans un mouvement de relaxation pour atteindre un équilibre stable où enfin l'énergie libre totale du système est au minimum. Il suffit de prendre l'exemple de l' α -tocophérol (amphiphile à chaîne isoprène) qui, par un mouvement transmembranaire, va migrer de la face interne vers la face externe (tableau I dans Bellemare et Fragata, 1981). Par ailleurs, la forte courbure de surface d'une petite vésicule unilamellaire peut influencer beaucoup la durée de ce temps de relaxation des molécules d'amphiphiles, lequel n'est pas encore réellement connu.

D'après les spectres d'absorption des préparations de vésicules mixtes contenant la Chla, on n'a pas trouvé une seule évidence prouvant la formation d'agrégats du pigment dans la bicouche lipidique (cas aussi observé par Hurley et al, 1980). Il semblerait que l'augmentation de la proportion de la Chla, dans le mélange initial avec la PC, favoriserait le rapprochement entre les molécules du pigment pour former des agrégats. Mais comme il y a saturation dans l'incorporation, l'agrégation de la Chla dans la bicouche est moins probable. À mon avis, s'il y a réellement agrégation, elle se produirait en dehors de la bicouche; ainsi, il y aurait formation de structures contenant de la Chla dans la phase aqueuse qui se précipiteraient durant la centrifugation. On a remarqué en effet que le culot dans le tube de centrifugation était de coloration verte pour les préparations de vésicules dont les fractions molaires initiales de Chla étaient élevées. En ce qui concerne d'autres agrégats possibles de Chla, ou bien ils sortent dans le volume final de la colonne (situation non confirmée par les profils d'élution), ou bien ils restent adsorbés sur le gel sépharose 4-B. À ce propos, on a remarqué que les colonnes de chromatographie prennent une coloration verte avec le temps.

IV.2. MÉLANGES STÉARYLAMINE - PHOSPHATIDYLCHOLINE

Du chapitre III, on retient surtout l'effet lytique de la SAM sur la dimension de la bicouche lipidique d'une petite vésicule unilamellaire. Ce phénomène est remarqué chez d'autres amphiphiles à chaîne aliphatique simple. Ainsi, la lysophosphatidylcholine (lysoPC) est à l'origine de cet effet quand sa proportion atteint 50% dans un liposome (Mandersloot et al, 1975). D'autre part, Morris et al (1980) ont constaté que, dans des vésicules lipidiques constituées de phosphatidylcholine, lysophosphatidylcholine et pyrène, l'environnement de ce dernier est presque aqueux et ont conclu que l'eau a pénétré dans la bicouche lipidique lorsque la lysoPC était à 30% dans le mélange initial avec la PC. Cependant, au delà de cette proportion, l'environnement du pyrène devient hydrophobe, indiquant par le fait qu'il y a eu formation de micelles mixtes.

Ce pourcentage de la lysoPC (30 à 50%), auquel l'effet lytique se manifeste, est plus élevé comparativement à celui de la SAM (2%). Ceci pourrait être expliqué par le fait que la lysoPC a une tête polaire (une fonction phosphorylcholine) plus grosse que celle de la SAM (une amine primaire); par conséquent, ce dernier amphiphile pénètre plus profondément dans la bicouche et déstabilise rapidement la structure de cette dernière.

Par ailleurs, Deleers et al (1980) ont remarqué que l'absorbance d'une dispersion de vésicules mixtes unilamellaires (DPPC/SAM ou DMPC/SAM) augmentait dans les 10 minutes suivant la sonication, ce qui n'était pas le

cas pour une dispersion de DSPC/SAM. Ceci est expliqué par la similitude des chaînes carbonées de la DSPC (C18) et de la SAM (C18) qui permet une bonne partition et inclusion pour cette dernière dans une vésicule unilamellaire de DSPC.

À très forte concentration de SAM, il y a formation de micelles mixtes (pas nécessairement sphériques) d'une taille comparable à celle d'une petite vésicule unilamellaire de PC, et qui sortent, évidemment, au même volume élué sur le profil d'élution que cette dernière. Par conséquent, c'est probablement pour cette raison que la fraction molaire finale augmente pour la deuxième fois (voir fig. 25).

D'autre part, lors de la préparation d'un mélange binaire PC/SAM = 1/1, nous avons vérifié l'impossibilité d'effectuer une bonne dispersion de lipides pendant la sonication à 4 °C. Ainsi, nous étions obligés de chauffer le bain circulant dans la cellule à sonication à 25 °C pour que la solution devienne claire (résultat non montré). Ceci veut dire que la SAM a augmenté la température de transition gel-cristal liquide de la PC. Ce phénomène a été aussi constaté par Deleers et al (1982b). En outre, Mabrey et Sturtevant (1977) ont noté qu'un rapport DPPC/acide palmitique égal à l'unité donne naissance à une phase hexagonale dans le regroupement des chaînes carbonées.

IV.3. QUELQUES CONCLUSIONS CONCERNANT LE MODE D'INCORPORATION DES AMPHIPHILES À UNE SEULE CHAÎNE CARBONÉE.

Dans la figure 27, on fait une comparaison de l'incorporation de la Chl_a, de la SAM et de l' α -Toc. On remarque que la quantité incorporée de Chl_a est plus grande que celle de l' α -Toc pour une fraction molaire initiale donnée. Ceci pourrait signifier que les interactions de la Chl_a sont plus fortes que celles de l' α -Toc vis-à-vis de la PC qui compose la vésicule unilamellaire. Ceci peut aussi être le résultat de la différence entre les têtes polaires des deux amphiphiles (voir fig. 7) puisque leurs chaînes phytyles sont quasi-similaires. D'autre part, la Chl_a possède 4 sites d'interaction (3 groupements C = O et l'atome de magnésium) tandis que l' α -Toc n'en a qu'un seul (le groupement hydroxyle), et pour cette raison on peut postuler que le premier amphiphile est incorporé ("adsorbé") dans la bicouche lipidique de la vésicule unilamellaire à un degré plus élevé que le deuxième amphiphile.

Le changement dans le comportement de l'incorporation de la Chl_a et dans celle de l' α -Toc se traduit par une "transition de phase" qui pourrait indiquer, comme l'avaient souligné Bellemare et Fragate (1981), l'existence d'une concentration micellaire critique (CMC) pour ce type d'amphiphiles. Cette CMC se manifeste à une fraction molaire de 2,5% pour la Chl_a et de 4,0% pour l' α -Toc dans le mélange initial avec la PC.

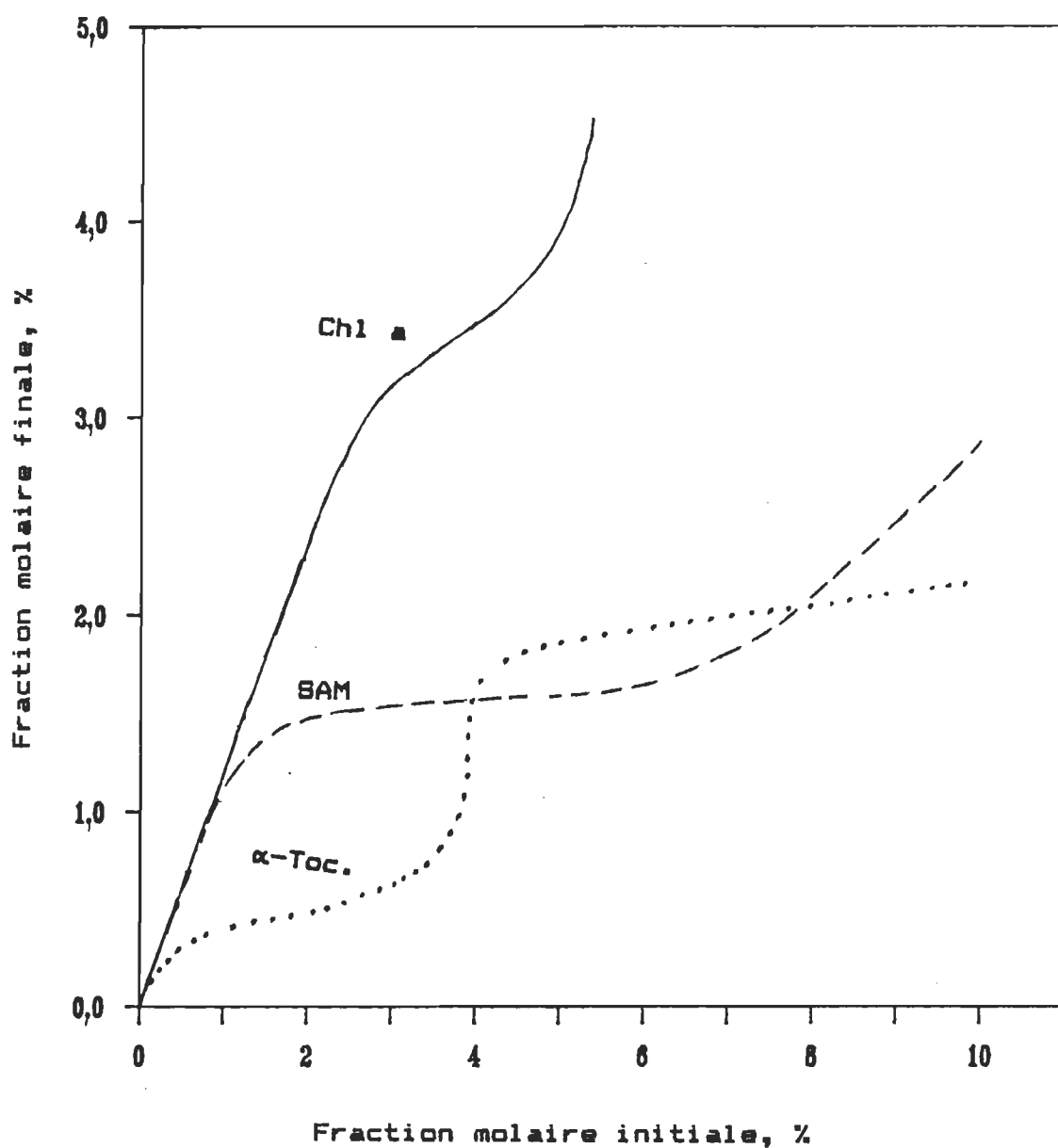


Figure 27. Comportement de l'incorporation d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée dans la bicouche lipidique d'une vésicule. La courbe pour l' α -tocophérol est tracée d'après la fig. 4 dans Bellemare et Fragata (1981). La proportion finale pour la SAM est réduite par un facteur de 5.

L'inclusion de la SAM suit aussi un comportement sigmoïde, mais sa quantité incorporée est beaucoup plus grande que celle des deux autres amphiphiles. À partir de 2,0% comme fraction molaire initiale de SAM, on est incapable de certifier l'existence des petites vésicules unilamellaires, et dans ce cas-ci, on peut parler de "transition structurale" plutôt que de transition de phase comme pour la Chla et l' α -Toc. Par transition structurale, on entend une transformation de la vésicule dans une autre structure qui pourrait être éventuellement une micelle.

À la figure 26, où on représente le rapport ext./tot. pour la SAM dans une vésicule unilamellaire, l'extrapolation à 0,0% comme fraction molaire initiale de SAM donne la valeur 0,64. Cette dernière donne l'aire de la surface de la monocouche externe par rapport à l'aire de la surface totale d'une petite vésicule unilamellaire préparée à partir de la PC pure. Yeagle et al (1976) ont trouvé une valeur de 0,68 pour ce rapport quand ils ont étudié l'effet du degré d'insaturation des chaînes carbonées sur la distribution transmembranaire des phospholipides dans une vésicule lipidique. Notons que cette extrapolation à 0,0% comme fraction molaire initiale d'additifs donne des valeurs qui se situent entre 0,64 (ce travail) et 0,71 pour l' α -tocophérol (Bellemare et Fragata, 1981) en passant par 0,67 pour la DMPE (Lentz et Litman, 1978) et 0,70 pour la PE (Litman, 1973) et la Chla (Ford et Tollin, 1982). Ainsi, indépendamment du type d'amphiphile incorporé (une seule chaîne carbonée ou deux, chaîne saturée ou insaturée), cette valeur est constante pour le rapport ext./tot. des

surfaces d'une petite vésicule unilamellaire. Ceci est évident puisque l'additif n'a pas d'effet sur la structure de la vésicule.

Cependant, le maximum dans le rapport ext./tot. varie d'un amphiphile à l'autre car la composition en acides gras des chaînes carbonées a un effet sur la distribution des molécules de phospholipides à travers la bicouche lipidique (Lentz et Litman, 1978). Pour le cas de la PE, ce maximum est à une fraction molaire initiale inférieure à 10% tandis que pour la DPPE, il se trouve à 25 - 30% comme fraction molaire initiale. Cette différence doit clairement être due au degré d'insaturation des chaînes carbonées de ces deux lipides (DPPE: chaîne saturé, PE: chaîne insaturée). Quant aux deux amphiphiles à une seule chaîne, la différence entre les maximums (un à 3,0% pour l' α -Toc et l'autre à 5,5% pour la SAM) résulte de celle entre les chaînes carbonées (une à unités isoprènes et l'autre est aliphatique beaucoup plus simple).

Finalement, l'amphiphile à faible fraction molaire dans le système obéirait aux mêmes lois de regroupement que les molécules de PC. On présume qu'il subit une répartition normale, c'est-à-dire que le rapport externe/interne du nombre d'amphiphiles est proportionnel au rapport externe/interne des surfaces de la vésicule. Cela signifie aussi, probablement, que les sites d'"adsorption" disponibles ont la même probabilité d'être occupés par les molécules de l'additif. On estime qu'en augmentant la proportion de l'amphiphile dans le mélange initial, on augmenterait par le fait même la probabilité que l'additif rencontre un site d'adsorption.

En résumé, ce travail sur l'incorporation d'amphiphiles à une seule chaîne carbonée (chlorophylle a, stéarylamine) dans les vésicules lipidiques unilamellaires nous a permis de mettre en relief les faits suivants:

a- un amphiphile doté d'une chaîne à unités isoprènes est inclus dans la couche bilipidique et y atteint une limite sans que le système lamellaire de la petite vésicule perde sa structure de bicouche. En d'autres termes, il y a saturation pour le "soluté" amphiphile à chaîne isoprène dans le "solvant" vésicule unilamellaire formée de phosphatidylcholine.

b- un amphiphile avec une chaîne aliphatique plus simple cause un effet soi-disant lytique sur la structure lamellaire de la bicouche lipidique. On parle d'effet soi-disant lytique parce qu'on ne sait pas réellement si la SAM solubilise la PC ou si elle induit simplement un changement de structure de la petite vésicule unilamellaire.

Quant à la relation entre la structure chimique de l'amphiphile et sa quantité solubilisée dans la bicouche de la petite vésicule, il faut encore étudier chaque cas séparément. Cela veut dire qu'il est impossible de généraliser uniquement à partir de ce travail. Il est vrai que les amphiphiles à chaîne aliphatique simple déstabilisent la structure d'une bicouche mais ce n'est pas toujours à la même proportion incorporée (ex. SAM et lysoPC). De plus, un amphiphile à deux chaînes simples peut provoquer une

transition dans la structure lamellaire d'une vésicule (ex. au delà de 70% de DMPE dans la DMPC, des petites vésicules unilamellaires ne peuvent être formées) (Lentz et Litman, 1978). En ce qui concerne les amphiphiles à chaînes isoprènes, la saturation de leur incorporation finale n'est pas fixe (voir tableau II). Ceci dépend de la nature de la matrice solubilisante. Ce type d'amphiphiles s'incorpore bien quand les chaînes carbonées de cette matrice sont insaturées (Rosenberg, 1967) et de la même longueur que la chaîne carbonée de l'amphiphile (Maggio et al, 1977).

Finalement, un des paramètres les plus importants et un des difficiles à contrôler est sans doute la courbure de la surface des petites vésicules unilamellaires. Leur forte courbure affecte énormément le regroupement des chaînes carbonées dans la bicouche en leur imposant des restrictions géométriques (Schuh et al, 1982). Par conséquent, il serait très souhaitable de travailler avec des vésicules unilamellaires assez larges pour que l'on puisse négliger l'effet de la courbure. En outre, la densité d'encombrement des molécules n'est pas la même pour la face interne et la face externe. Cette dernière est plus dynamique (Ford et Tollin, 1982) et, de ce fait, la conclusion de Dijkmans et al (1979b) que la $Chla$ augmente le nombre de molécules de PC par vésicule reste discutable, puisque les auteurs se sont basés sur l'hypothèse de la densité d'encombrement semblable des deux monocouches. Ainsi l'application de l'équation de Svedberg (voir e.g. Dijkmans et al, 1979b) au calcul du poids moléculaire et du nombre de molécules par vésicule, devrait être faite avec précaution.

RÉFÉRENCES

ADAMSON A.W. (1982). Physical chemistry of surfaces, 4^e éd., Wiley & Sons, New York

ANDERSON J.M. (1975). The molecular organization of chloroplast thylacoids. Biochim. Biophys. Acta 416, 191

ANDERSSON B. et ANDERSON J.M. (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. Biochim. Biophys. Acta 593, 427

BANGHAM A.D.; STANDISH M.M. et WATKINS J.C. (1965). Diffusion of univalent ions across the swollen phospholipids. J. Mol. Biol. 13, 238

BARENHOLZ D.; GIBBES D.; LITMAN B.J.; GOLL J. THOMPSON T.E. et CARLSON D. (1977). A simple method for the preparation of homogenous phospholipid vesicles. Biochem. 16, 2806.

BARTLETT G.R. (1959). Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234, 466

BATZRI S. et KORN E.D. (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. Biochim. Biophys. Acta 298, 1015

BELLEMARE F. et FRAGATA M. (1981). Transmembrane distribution of α -tocopherol in single-lamellar mixed lipid vesicles. J. Memb. Biol. 58, 67

CARNIE S.; ISRAELACHVILLI J.N. et PAILTHORPE B.A. (1979). Lipid packing and transbilayer asymetries of mixed lipid vesicles. Biochim. Biophys. Acta 554, 340

CHAN S.I.; LINDSEY H.; EIGENBERG K.E.; CROASMUN W.R. et CAMPBELL G.W. (1979). The motional states of two unusual bilayer membrane systems: di-phytanoylphosphatidylcholine and chlorophyll a - distearoylphosphatidylcholine. NMR and Biochemistry, éd. Opella et Lu, New York, 249

DAS S. et RAND R.P. (1984). Diacylglycerol causes major structural transitions in phospholipid bilayer membranes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 124, 491

DELEERS M.; GUILMIN T.; LADURON C. et RUYSSCHAERT J.M. (1980). Stability of diacylphosphatidylcholine - stearylamine mixed liposomes. Arch. Int. Physiol. Biochim. 88, 5

DELEERS M.; GUILMIN T.; LADURON C. et RUYSSCHAERT J.M. (1982a). Physico-chemical properties of phosphatidylcholine liposomes containing stearylamine. J. Coll. Interf. Sci. 90, 229

DELEERS M.; GUILMIN C.; VANDENBRANDEN M. et RUYSSCHAERT J.M. (1982b). Thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine stearylamine liposomes. Pharmacol. Res. Comm. 14, 333

DIJKMANS H.; LEBLANC R.M.; COGNIAUX F. et AGHION J. (1979a). Properties of chlorophyll-lecithin vesicles: Ultracentrifugation, absorbance, emission and photobleaching. Photochem. Photobiol. 29, 367

DIJKMANS H.; COGNIAUX F. et AGHION J. (1979b). β -Carotene or chlorophyll a incorporated in lecithin liposomes: Analysis by ultracentrifugation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 89, 1141

DIPLOCK A.T. et LUCY J.A. (1973). The biochemical modes of action of vitamin E and selenium: A hypothesis. FEBS Lett. 29, 205

EIGENBERG K.E.; CROASMUN W.R. et CHAN S.I. (1981). Evidence from ^{13}C -NMR of the photosynthetic spinach thylakoid membrane. Biochim. Biophys. Acta 642, 438

EYTAN G.D. et BROZA R. (1978). Role of charge and fluidity in the incorporation of cytochrome oxidase into liposomes. J. Biol. Chem. 253, 3196

FENDLER J.H. (1981). Aspects of artificial photosynthesis in surfactant vesicles. J. Photochem. 17, 303

FIELDS R. (1971). The measurement of amino groups in proteins and peptides Biochem. J. 124, 581

FORD W.E. et TOLLIN G. (1982). Chlorophyll photosensitized electron transfer in phospholipid vesicles bilayers: Inside vs outside asymetry. Photochem. Photobiol. 36, 647

FRAGATA M. (1977). On the location of the tetrapyrrole macrocycle of chlorophyll a in phospholipid vesicles and in hexadecane. Experientia 33, 177

FRAGATA M.; OHNISHI S.; ASADA K.; ITO T. et TAKAHASHI M. (1984). Lateral diffusion of plastocyanin in multilamellar mixed-lipid bilayers studied by fluorescence recovery after bleaching. Biochem. 23, 4044

FRAGATA M.; EL-KINDI M. et BELLEMARE F. (1985). Mixing of single-chain amphiphiles in two-chain lipid bilayers. 2.Characteristics of chlorophyll a and α -tocopherol incorporation in unilamellar phosphatidylcholine vesicles. Chem. Phys. Lipids 37, 117

GOLDFARB A.R. (1966). A kinetic study of the reactions of amino-acids and peptides with trinitrobenzenesulfonic acid. Biochem. 5, 2570

GREGORIADIS G. (1976a). The carrier potentiel of liposomes in biology and medicine. New Engl. J. Med. 295, 704

GREGORIADIS G. (1976b). The carrier potentiel of liposomes in biology and medicine. New Engl. J. Med. 295, 765

HAEST C.W.M.; KAMP D. et DEUTICKE B. (1981). Penetration of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate into human erythrocytes: Consequences for studies on phospholipid asymetry. Biochim. Biophys. Acta 640, 535

HAUSON H. et GUYER W. (1979). Clustering of fatty acids in phospholipid bilayers. Biochim. Biophys. Acta 553, 359

HAYDON D.A. et TAYLOR J. (1963). The stability and properties of biomolecular lipid leaflets in aqueous solutions. J. Theor. Biol. 4, 281

HELMKAMP Jr. G.M. (1980). Interaction of bovine brain phospholipid exchange protein with liposomes of different lipid composition. Biochim. Biophys. Acta 595, 222

HUANG C. (1969). Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics. Biochem. 8, 344

HUANG C.; CHARLETON J.P.; SHYR C.I. et THOMPSON T.E. (1970). Studies on phosphatidylcholine vesicles with thiocholesterol and a thiocholesterol-linked spin label incorporated in the vesicle wall. Biochem. 9, 3422

HUPFER B. et RINGSDORF H. (1981). Polymeric monolayers and liposomes as models for biomembranes and cells. Polym. Sci. Overview, ACS Symp. Series No. 175, ed. Stahl G.A., 209

HURLEY J.K.; CASTELLI F. et TOLLIN G. (1980). Chlorophyll photochemistry in condensed media. II. Triplet state quenching and electron transfer to quinone in liposomes. Photochem. Photobiol. 32, 79

ISRAELACHVILLI J.N.; MITCHELL D.J. et NINHAM B.W. (1976). Theory of self-association of hydrocarbon amphiphiles into micelles and bilayers. J. Chem. Soc., Faraday Trans. II 72, 1525

ISRAELACHVILLI J.N.; MARCELJA S. et HORN R.G. (1980). Physical principles of membrane organization. Quart. Rev. Biophys. 13, 121

JANSONS V.K.; WEIS P.; CHEN T.-H. et REDWOOD W.R. (1978). In vitro interaction of L1210 cells with phospholipid vesicles. Cancer Res. 38, 531

JONAH M.M.; CERNAY E.A. et RAHMAN Y.E. (1975). Tissue Distribution of EDTA Encapsulated within Liposomes of Varying Surface Properties. Biochim. Biophys. Acta 401, 336

KANTOR H.L. et PRESTEGARD J.H. (1978). Fusion of phosphatidylcholine bilayer vesicles: Role of free fatty acids. Biochem. 17, 3592

KATSIKAS H. et QUINN P.J. (1982). The distribution of ubiquinone-10 in phospholipid bilayers: A study using differential scanning calorimetry. Eur. J. Biochem. 124, 165

KATZ J.J. (1979). Chlorophyll-lipid interactions. Advances in the biochemistry and physiology of plant lipids, éd. Appelqvist et Liljenberg, Elsevier/North-Holland Biomedical Press

LEE A.G. (1975). Segregation of chlorophyll a incorporated into lipid bilayers. Biochem. 14, 4397

LENTZ B.R. et LITMAN B.J. (1978). Effect of head group on phospholipid mixing in small, unilamellar vesicles: Mixtures of dimyristoylphosphatidylcholine and dimyristoylphosphatidylethanolamine. Biochem. 17, 5537

LEUNG J.G.M. (1980). Liposomes: Effect of temperature on their mode of action on single frog skeletal muscle fibers. Biochim. Biophys. Acta 597, 427

LICHTENTHALER H.K. et PARK R.B. (1963). Chemical composition of chloroplast lamellae from spinach. Nature 198, 1070

LICHTENTHALER H.K. (1979). Occurrence and function of prenyllipids in the photosynthetic membrane. Advances in the Biochemistry and Physiology of Plant Lipids. éd. Appelqvist et Liljenberg, Elsevier/North-Holland biomedical Press

LITMAN B.J. (1973). Lipid model membranes: Characterization of mixed phospholipid vesicles. Biochem. 12, 2545

MABREY S. et STURTEVANT J.M. (1977). Incorporation of saturated fatty acids into phosphatidylcholine bilayers. Biochim. Biophys. Acta 486, 444

MAGGIO B.; DIPLOCK A.T. et LUCY J.A. (1977). Interactions of tocopherols and ubiquinones with monolayers of phospholipids. Biochem. J. 161, 111

MANDERSLOOT J.G.; REMAN F.C.; VAN DEENEN L.L.M. et DE GIER J. (1975). Barrier properties of lecithin/lysolecithin mixtures. Biochim. Biophys. Acta 382, 22

MASON J.T. et HUANG C. (1978). Hydrodynamic analysis of egg phosphatidylcholine vesicles. Ann. N.Y. Acad. Sci. 308, 29

MEANS G.E.; CONGDON W.I. et BENDER M.L. (1972). Reactions of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate ion with amines and hydroxide ion. Biochem. 11, 3564

MORRIS D.A.N.; McNEIL R.; CASTELLINO F.J. et THOMAS J.K. (1980). Interaction of lysophosphatidylcholine with phosphatidylcholine bilayers. Biochim. Biophys. Acta 599, 380

MUKERJEE P. (1975). Physical chemistry: Enriching topics from colloid and surface science. IUPAC, éd. Olphen et Mysels, Californie

NAGARAJAN R. et RUCKENSTEIN E. (1979). Aggregation of amphiphiles as micelles or vesicles in aqueous media. J. Coll. Interf. Sci. 71, 580

NEWMAN G.C. et HUANG C. (1975). Structural studies on phosphatidylcholine-cholesterol mixed vesicles. Biochem. 14, 3363

DETTMEIER W.; NORRIS J.R. et KATZ J.J. (1976). Evidence for the localization of chlorophyll in lipid vesicle: A spin label study. Biochem. Biophys. Res. Comm. 71, 445

OMATA T. et MURATA N. (1980). Rapid and efficient method to prepare chlorophyll a and b from leaves. Photochem. Photobiol. 31, 183

PAL S. et MOULIK S.P. (1983). Cholesterol solubility in mixed micellar solutions of ionic and non-ionic surfactants. J. Lipid Res. 24, 1281

PANZNER E.A. et JANSON V.K. (1979). Control of in vitro cytotoxicity of positively charged liposomes. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 95, 29

POSTE G. et PAPAHAJIOPOULOS D. (1978). The influence of vesicle membrane properties on the interaction of lipid vesicles with cultured cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 308, 164

RITT E. et WALZ D. (1976). Pigment containing lipid vesicles. I. Preparation and characterization of chlorophyll a - lecithin vesicles. J. Memb. Biol. 27, 41

ROSENBERG A. (1967). Galactosyl diglycerides: Their possible function in Euglena chloroplasts. Science 157, 1191

SCHMIDT D.; STEFFEN H. et VON PLANTA C. (1976). Lateral diffusion, order parameter and phase transition in phospholipid bilayer membranes containing tocopherol acetate. Biochim. Biophys. Acta 443, 1

SCHMIDT W. (1983). Further photophysical and photochemical characterization of flavins associated with single-shelled vesicles. J. Memb. Biol. 76, 73

SCHUH J.R.; BANERJEE U.; MÜLLER L. et CHAN S.I. (1982). The phospholipid packing arrangement in small bilayer vesicles as revealed by proton magnetic resonance at 500 MHz. Biochim. Biophys. Acta 687, 219

SESSA G. et WEISSMANN G. (1968). Phospholipid spherules (liposomes) as model of biological membranes. J. Lipid Res. 9, 310

SHARMA P.; TYRRELL D.A. et RYMAN B.E. (1977). Some properties of liposomes of different sizes. Biochem. Soc. Trans. 5, 1146

SINGLETON W.S.; GRAY M.S.; BROWN M.L. et WHITE J.L. (1965). Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. J. Am. Oil Chem. 42, 53

STILLWELL W. et TIEN H.T. (1977). Protection of chlorophyll by phospholipids from photooxidation. Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 232

SUNAMOTO J.; IWAMOTO K.; TEZOKA T.; KADOSAKI K. et KONDO H. (1983). Liposomal membranes. XIV. Fusion of liposomal membranes induced by polyisoprenoid as monitored by fluorescence quenching method. Chem. Phys. Lipids 33, 127

TANFORD C. (1973). The hydrophobic effect: Formation of micelles and biomembranes. éd. Wiley J., New York

TANFORD C. (1974). Theory of micelle formation in aqueous solutions. J. Phys. Chem. 78, 2469

TANFORD C. (1980). The hydrophobic effect: Formation of micelles and biomembranes. 2^e éd, Wiley & Sons, New York

THOMPSON T.E.; HUANG C. et LITMAN B.J. (1974). Bilayers and biomembranes: Compositional asymetries induced by surface curvature. The Cell Surface in Development. éd. Mascona, Wiley, New York et London

TOMKIEWICZ M. et CORKER G.A. (1975). Chlorophyll sentisized charge separation in phospholipid vesicles. Photochem. Photobiol. 22, 249

WARSHEL A. (1979). On the origin of the red shift of the absorption spectra of aggregated chlorophylls. J. Am. Chem. Soc. 101, 744

WIRTZ K.W.A.; GEURTS VAN KESSEL W.S.M.; KAMP H.H. et DEMEL R.A. (1976). The protein-mediated transfer of phosphatidylcholine between membranes. Eur. J. Biochem. 61, 515

YAMAUCHI R. et MATSUSHITA S. (1979). Lateral diffusion in the hydrophobic region of phospholipid liposomes containing tocopheryl acetates. Agric. Biol. Chem. 43, 357

YEAGLE P.L.; HUTTON W.C.; MARTIN R.B.; SEARS B. et HUANG C. (1976). Trans-
membrane asymetry of vesicle lipids. J. Biol. Chem. 251, 2110